



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

ITqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

40 **ANOS** **FCT**
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Estudo do transcrito da *Legionella pneumophila* após co-cultura em *Acanthamoeba castellanii*

Neuza Isabel Rascôa Albano

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

outubro 2019



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

ITqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

40 **ANOS**
FCT
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Estudo do transcrito da *Legionella pneumophila* após co-cultura em *Acanthamoeba castellanii*

Neuza Isabel Rascôa Albano

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadores:

Doutora Maria de Jesus Chasqueira (NMS|FCM)

Prof. Doutor Paulo Paixão (NMS|FCM)

Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas

outubro 2019



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

itqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

40 **ANOS** **FCT**
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha mãe e ao meu padrasto por todo o esforço que fizeram de modo a permitir que esta tese e todos os anos até ela se concretizassem.

Uma peça essencial durante a realização desta tese a quem quero agradecer de uma forma muito especial, à Mariana, por me ter permitido ficar na sua casa durante os dois anos que frequentei o Mestrado, por me ouvir quando as coisas corriam menos bem e pelas horas de espera para jantar.

À Professora Maria de Jesus Chasqueira, minha orientadora, e ao Professor Paulo Paixão pela partilha de conhecimentos, pela sua prontidão em ajudar e pela sua paciência nas correções.

Um agradecimento também muito especial à Lúcia Rodrigues, o meu pilar dentro do laboratório durante todo o percurso, obrigada pela ajuda com as técnicas no início, obrigada pelo apoio quando as coisas não pareciam estar a correr bem.

À Augusta Marques por estar sempre pronta a esclarecer qualquer dúvida, obrigada pelos bolinhos que tão bem sabiam depois de almoço.

Obrigada à colega e amiga Julieta Silva pelas vezes que me deixou pernoitar na sua casa, pelas horas que esperou por mim no laboratório e pela sua disponibilidade para me ouvir sempre que era preciso. Obrigada também à Cláudia Fernandes por tentar sempre animar aquelas tardes que passávamos sentadas à secretária a procurar artigos, pelas leituras que fez da minha introdução, pela companhia no autocarro, pela boa amizade que criámos. Agradeço às duas a imensa paciência que tiveram comigo.

Resumo

As bactérias do género *Legionella* são bacilos Gram-negativos e no seu ambiente natural utilizam algumas espécies de protozoários para se replicarem, no homem infetam os macrófagos alveolares, podendo originar uma pneumonia grave.

No presente trabalho foi utilizada uma estirpe, *Legionella pneumophila* subespécie *fraseri* (ST1905), proveniente do 3º maior surto a nível mundial de Doença dos Legionários, que ocorreu em 2014, no concelho de Vila Franca de Xira. Observou-se que, morfológicamente, esta estirpe é diferente da ST1 o que está de acordo com o pleomorfismo descrito para bactérias deste género. Para caracterizar a estirpe foi investigado o tempo de duplicação, tendo-se obtido um valor de 75 minutos e o tempo de viabilidade em água potável, verificando-se que as bactérias conseguem sobreviver nestas condições por mais de 132 dias.

Foi igualmente estudada a capacidade que *Acanthamoeba castellanii* (Ac) tem de internalizar esta estirpe e qual a sua taxa de multiplicação intracelular neste hospedeiro natural. Os resultados revelaram que ambas variaram consoante o MOI testado (MOI10, 100 e 1000), no entanto sugerem que existe um limite de bactérias que cada ameba consegue fagocitar e que o MOI10 apresenta uma taxa de multiplicação superior aos restantes MOIs estudados.

Relativamente ao objetivo de estudar a expressão génica após a interação com Ac e comparar os resultados com os obtidos anteriormente na estirpe ST1, verificou-se que dada a heterogeneidade genética descrita para o género *Legionella*, dos 13 genes selecionados apenas oito amplificaram na estirpe ST1905. Quatro estão descritos como sendo relevantes para a capacidade de sobrevivência e de multiplicação da bactéria dentro dos hospedeiros. Destes, dois (lpp0845 e lpp0972) foram reprimidos, o lpp1315 e o lpp1316 não apresentaram alterações na expressão após passagem pela Ac. Estes resultados sugerem que a passagem por este hospedeiro não aumenta a virulência da estirpe ST1905.

Palavras-chave: *Legionella*, *Acanthamoeba castellanii*, expressão génica, qPCR

Abstract

Bacteria of the genus *Legionella* are Gram-negative bacilli and in their natural environment use some species of protozoa to replicate themselves, in humans infect alveolar macrophages, which can lead to severe pneumonia.

In the present work was used a strain, *Legionella pneumophila* subspecies *fraseri* (ST1905), from the 3rd largest outbreak of Legionnaires Disease in the world, that occurred in 2014, in the municipality of Vila Franca de Xira. It was observed that, morphologically, this strain is different from ST1 which is in accordance with the pleomorphism described for bacteria of this genus. To characterize the strain, it was investigated the duplicating time, obtaining a value of 75 minutes and the viability in drinking water, verifying that the bacteria can survive in these conditions for more than 132 days.

It was also studied the internalization capacity of *Acanthamoeba castellanii* (Ac) and the intracellular multiplication rate of the strain in natural hosts. The results revealed that both varied according to the MOI tested (MOI10, 100 and 1000), however, suggest that there is a limit of bacteria that each amoeba can phagocyte and that the MOI10 has a multiplication rate higher than the other studied MOIs.

Regarding the objective of studying gene expression after interaction with Ac and comparing the results with those previously obtained in strain ST1, it was found that given the genetic heterogeneity described for the genus *Legionella*, of the 13 selected genes only eight amplified in strain ST1905. Four are described as being relevant to the survival and multiplication capacity of the bacteria within the hosts. Of these, two (lpp0845 and lpp0972) were repressed and the lpp1315 and the lpp1316 showed no changes in expression after passing by Ac. These results suggest that passage through this host does not increase virulence of strain ST1905.

Keywords: *Legionella*, *Acanthamoeba castellanii*, gene expression, qPCR

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Índice	v
Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas	viii
Índice de figuras	x
Índice de tabelas.....	xi
Índice de anexos	xii
1. Introdução	1
1.1. Doença dos Legionários.....	1
1.1.1. Enquadramento histórico.....	1
1.1.2. Clínica.....	1
1.1.3. Diagnóstico Laboratorial.....	2
1.1.4. Terapêutica.....	4
1.1.5. Epidemiologia	5
1.1.6. Controlo e prevenção	5
1.2. <i>Legionella pneumophila</i>	7
1.2.1. Características gerais.....	7
1.2.2. Ciclo de Vida	7
1.2.3. Estudo da expressão génica	9
1.2.3.1. PCR em tempo real.....	10
1.3. Objetivos.....	12
2. Material e Métodos.....	13
2.1. Material biológico.....	14
2.1.1. <i>Legionella pneumophila</i>	14
2.1.2. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	15
2.2. Procedimentos.....	15

2.2.1.	Morfologia da estirpe ST1905	15
2.2.2.	Teste de viabilidade.....	15
2.2.3.	Quantificação de suspensão para os ensaios de co-cultura.....	16
2.2.4.	Preparação da cultura em meio AYE para o estudo da expressão génica	16
2.2.5.	Determinação do tempo de duplicação	17
2.2.6.	Ciclos de co-cultura	17
2.2.6.1.	Protocolo para o estudo da replicação intracelular	17
2.2.6.2.	Protocolo para o estudo da expressão génica.....	20
2.2.7.	Estudo da expressão génica	21
2.2.7.1.	Extração do RNA, tratamento com DNase e síntese do cDNA	21
2.2.8.	PCR em tempo real.....	21
2.2.9.	Quantificação Relativa.....	23
3.	Resultados e Discussão.....	24
3.1.	Morfologia da estirpe ST1905	24
3.2.	Teste de viabilidade.....	24
3.3.	Quantificação de suspensão para os ciclos de co-cultura	25
3.4.	Preparação da cultura AYE para o estudo da expressão génica.....	25
3.5.	Determinação do tempo de duplicação em cultura líquida	27
3.6.	Estudo da replicação intracelular	28
3.7.	Estudo da expressão génica	29
4.	Conclusões.....	34
5.	Bibliografia.....	36
6.	ANEXOS.....	44

Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

μm – Micrómetro

$^{\circ}\text{C}$ – Graus celsius

AVAC – Aquecimento, ventilação e ar condicionado

AYE – do inglês: ACES Yeast Extract

BCYE- α – do inglês: *Buffered Charcoal Yeast Extract*

cDNA- do inglês: Complementar Deoxyribonucleic acid

Ct – do inglês: Threshold cycle

Cy – Cianina

DL – Doença dos Legionários

DNA – do inglês: Deoxyribonucleic acid

DNase – Desoxiribonucleases

dNTP'S – do inglês: Deoxyribonucleotide Triphosphates

DO – Densidade ótica

Dot|Icm – do inglês: Dot: defective in organelle trafficking| Icm: Intracellular multiplication

EnhC – do inglês: Enhanced Entry protein

G – Calibre da agulha

g – Força centrífuga

Hsp60 – do inglês: Heat Shock protein

LAMP – do inglês: Loop mediated isothermal amplification

LCV – do inglês: *Legionella* containing vacuole

Lp – *Legionella pneumophila*

Lp Sg1 – *Legionella pneumophila* serogrupo 1

MALDI-TOF MS – do inglês: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry

MIF – do inglês: Mature intracellular form

mip – do inglês: Macrophage infectivity potentiator

MOMP - do inglês: Major outer membrane protein

PCR – do inglês: Polimerase Chain Reaction

PilE – do inglês: Type IV pilin

ppGpp – Guanosina 3', 5' – bpirofosfato

PYG – do inglês: Peptone Yeast Extract

qPCR – do inglês: Quantitative PCR

RNA – do inglês: Ribonucleic acid

RNase – do inglês: Ribonucleases

RNA-Seq – do inglês: RNA sequencing

rpm – Rotações por minuto

SNPs – do inglês: single-nucleotide polymorphism

ST – do inglês: Sequence Type

T4SS – do inglês: Type IV secretion system

TAC – do inglês: TaqMan Array Card

T_m – do inglês: Melting temperature

UFC – Unidades formadoras de colónias

UV – Ultravioleta

Índice de figuras

Figura 1 - Cultura de <i>Legionella pneumophila</i> em meio BCYE- α	3
Figura 2 - Processo de internalização da <i>Lp</i> por “coiling phagocytosis”	8
Figura 3 - Técnica de Miles e Misra	16
Figura 4 - Fluxograma do ciclo de co-cultura para o estudo da replicação intracelular	18
Figura 5 - Camada confluyente de <i>Acanthamoeba castellanii</i> aderidas ao fundo do frasco.....	18
Figura 6 - Fluxograma do ciclo de co-cultura para o estudo da expressão génica.....	20
Figura 7 - Programa de PCR tempo real utilizado no presente estudo.....	23
Figura 8 - Coloração pelo método de Gram de Legionella, incubada a 37°C durante 24h em BCYE- α	24
Figura 9 - Teste de viabilidade para a estirpe ST1905, método de Miles e Misra	25
Figura 10 - Curvas de crescimento da estirpe ST19905 em AYE, DO iniciais (T0) superiores a 0,300	26
Figura 11 - Curvas de crescimento da estirpe ST1905 em AYE, DO iniciais (T0) inferiores a 0,100.....	26
Figura 12 - Valores expressos em Log10 Tn (UFC/(mL do lisado de AC após 24h de co-cultura))/T0 ((UFC)/(mL do lisado de AC após periodo de contato com <i>Lp</i>)) que representam as taxas de multiplicação dos diferentes MOIs	28
Figura 13 - Curvas de dissociação e Tm para os oito pares de primers analisados.	31

Índice de tabelas

Tabela 1 - <i>Primers</i> selecionados para a avaliação da expressão génica da <i>Lp</i> estirpe <i>fraseri</i> por qPCR.....	22
Tabela 2 - Média de três ensaios de quantificação para diferentes DO _{550NM}	25
Tabela 3 - Resultados da quantificação de bactérias internalizadas às 0h e bactérias extracelulares ao fim das 24h. São apresentados os valores médios de 3 ensaios para cada MOI.....	29
Tabela 4 - Resultados obtidos nos ensaios de replicação intracelular em <i>Ac</i> . São apresentados os valores médios de 3 ensaios para cada MOI.....	29
Tabela 5 - Comparação dos Cts obtidos com diferentes concentrações de RNA.	30
Tabela 6 - Comparação dos valores de expressão relativa de RNAm utilizando a média geométrica dos dois genes de referência e de cada um em separado.....	32
Tabela 7 – Contagem de UFC da cultura líquida na fase estacionária.	49
Tabela 8 – Média dos três ensaios do número de gerações e do tempo de duplicação.	49
Tabela 9 - Média dos dois genes de referência para cada ensaio.	50
Tabela 10 - Resultados do 1ºensaio da expressão génica da estirpe ST1905 após passagem em <i>Ac</i>	50
Tabela 11 – Resultados do 2º ensaio da expressão génica da estirpe ST1905 após passagem em <i>Ac</i>	51
Tabela 12 - Resultados do 3º ensaio da expressão génica da estirpe ST1905 após passagem em <i>Ac</i>	51
Tabela 13 - Resultados do 4º ensaio da expressão génica da estirpe ST1905 após passagem em <i>Ac</i>	52

Índice de anexos

Anexo I – Protocolos dos meios utilizados no estudo.....	44
A- Meio de <i>Thioglycollate</i> – Meio de conservação	44
B- Meio BCYE-α	44
C- Meio Líquido (AYE)	44
D- Meio de multiplicação – PYG.....	45
E- Meio de infecção - MI	46
Anexo II - Protocolo de descongelação das amibas	47
Anexo IV – Resultados do tempo de duplicação.....	49
Anexo V – Resultados da expressão relativa do RNAm	50

1. Introdução

1.1. Doença dos Legionários

1.1.1. Enquadramento histórico

Em julho de 1976, na 58ª Convenção da Legião Americana em Filadélfia, ocorreu um surto de pneumonia. Dos 4400 participantes, 182 ficaram doentes, dos quais 147 necessitaram de internamento, tendo-se verificado 29 mortes, o que corresponde a uma taxa de letalidade de 16% (Fraser et al, 1977). A bactéria *Legionella*, o agente responsável pelo surto, foi identificada por McDade em 1977 tendo a doença sido designada de Doença dos Legionários (DL) (McDade et al, 1977). A caracterização da bactéria levou à criação de um novo género bacteriano, *Legionella*, e de uma nova família, *Legionellaceae*. Inicialmente propôs-se a criação de três géneros separados, *Legionella*, *Flouribacter* e *Tatlockia*, devido aos baixos valores de hibridização de DNA entre algumas espécies de *Legionella* (Garrity et al, 1980), no entanto, com a evolução da ciência, foi possível com base na análise das sequências de 16s RNA, verificar que todas as espécies estão altamente relacionadas (> 95%), definindo-se assim apenas um género, *Legionella* (Fry et al, 1991). Atualmente existem 61 espécies (<http://www.bacterio.net/legionella.html>) e mais de 70 serogrupos diferentes inseridos no género *Legionella* (Mercante et al, 2015), sendo a espécie *Legionella pneumophila* (Lp) a mais estudada.

1.1.2. Clínica

Este agente etiológico pode ser associado a duas formas clínicas, a DL, que geralmente se apresenta como uma pneumonia grave, mas com um padrão de disfunção multissistémico e a Febre de Pontiac, uma infeção brônquica autolimitada (Dias et al, 2017; Fields et al, 2002).

A transmissão da bactéria ocorre por inalação de aerossóis contaminados (Khodr et al, 2016). Esta é frequentemente encontrada em ambientes de água doce, mas o risco de contaminação acontece a partir das estruturas criadas pelo homem que produzem aerossolização de água (Hilbi et al, 2011). Até à presente data existe apenas uma evidência de que pode ocorrer transmissão Homem-Homem (Correia et al, 2016).

A DL é caracterizada por pneumonia, tem um período de incubação que pode variar de 2 a 14 dias e não apresenta características clínicas específicas. De entre os diferentes sintomas destacam-se: febres superiores a 38.8°C, tosse, arrepios, dispneia, anomalias neurológicas, mialgia ou artralgia, diarreia, dor torácica, cefaleia, náuseas e vômitos (Phin et al, 2014; Cunha et al, 2016). A taxa de mortalidade da doença varia entre os 8 e os 12%, mas esta pode aumentar devido a fatores de risco individuais (Dominguez et al, 2009) como, ter idade superior a 50 anos, ser do sexo masculino, ser fumador, ter doença pulmonar obstrutiva crónica ou estar a fazer terapêutica imunossupressora (Diegues et al, 2013).

A Febre de Pontiac, é uma infeção autolimitada que apresenta os seguintes sintomas: cefaleia, mialgia, febre e arrepios no período de 3 dias após o suposto contacto com aerossóis contaminados com *Legionella*. Estes sintomas podem persistir até 8 dias (Tossa et al, 2006).

1.1.3. Diagnóstico Laboratorial

Um diagnóstico precoce permite a aplicação da antibioterapia correta, o que leva a uma diminuição da mortalidade e morbilidade associadas à DL (Phin et al, 2014). O diagnóstico da doença é feito apenas em doentes que apresentem pneumonia (critério clínico). Dependendo do tipo de amostra e do teste utilizado os casos podem ser classificados como confirmados ou prováveis. O isolamento da bactéria em cultura, a deteção do antígeno na urina e o aumento dos anticorpos para *Lp* serogrupo 1 são os testes que permitem a confirmação dos casos (Marques et al, 2003).

O isolamento de *Legionella* em cultura é o método de diagnóstico considerado *gold standard*, uma vez que permite um diagnóstico confirmado para qualquer espécie ou serogrupo de *Legionella*. Apresenta uma especificidade de 100%, mas uma sensibilidade de apenas 60%. A técnica permite a obtenção de isolados, essenciais para a realização de estudos epidemiológicos, de suscetibilidade a antibióticos e de virulência. Os produtos biológicos utilizados podem ser expetorações, líquido pleural, lavado bronco-alveolar e aspirados brônquicos, sendo que estes devem ser colhidos antes do início da antibioterapia, uma vez que após o seu início a bactéria perde viabilidade (Marques et al, 2003). Um dos requisitos do método é a utilização de um meio específico com extrato de levedura para fornecer azoto e carbono, com carvão ativado para decompor o peróxido de hidrogénio e absorver o dióxido de carbono (produtos metabólicos tóxicos para a *Legionella*), com α -cetoglutarato para estimular o crescimento, com pirofosfato férrico e ainda com L-cisteína, dois elementos essenciais ao seu crescimento, sendo que o meio mais utilizado é o BCYE- α (*buffered charcoal yeast extract*). Em geral as colónias de *Legionella* só aparecem ao fim de 3 a 5 dias de incubação a 37 °C, mas algumas espécies podem crescer a taxas ainda mais lentas necessitando de 10 dias de incubação. Por esta razão, este é o tempo mínimo para se garantir um resultado negativo (Diederen et al, 2008). As colónias devem ser observadas à lupa, na ampliação de 40x, onde será possível verificar que são convexas e arredondadas com os bordos lisos e bem definidos, apresentam um aspeto de “vidro moído” e geralmente o centro é branco, mas nos limites podem ter uma coloração azul, púrpura, verde ou vermelha (Jarraud et al, 2013) (Figura 1).

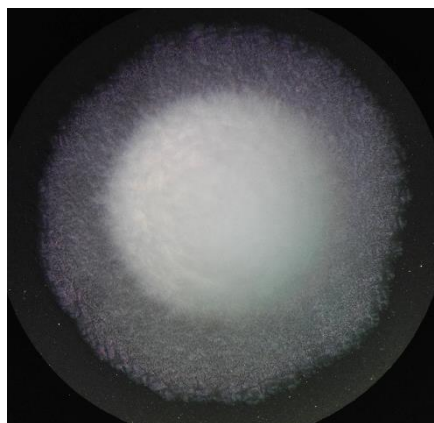


Figura 1 - Colónia de *Legionella pneumophila* em meio BCYE- α , observação à luoa (40x) (fotografia obtida durante a presente tese)

Atualmente um dos testes de diagnóstico mais utilizado é a deteção de antígenos na urina (antigenúria) devido à sua rapidez de resposta. Este método apresenta uma sensibilidade entre 56 a 99% e uma especificidade superior a 99%. Uma antigenúria positiva permite o diagnóstico confirmado apenas para *Lp* serogrupo 1, visto que atualmente em Portugal só são comercializados *kits* para o diagnóstico de infeções por este serogrupo. (Fields et al, 2002; Marques et al, 2003; Den Boer et al, 2004; Diederer et al, 2008).

A pesquisa de anticorpos no soro para a *Lp* sg1 permite um diagnóstico confirmado, se ocorrer um aumento significativo no título de anticorpos na segunda amostra de soro (aumento de quatro vezes em relação ao título da 1ª amostra). Caso exista apenas um título e este for igual ou superior a 256 é considerado um caso de DL provável. Quando se verifica um aumento significativo no título de anticorpos para *Lp* não serogrupo 1, ou para outras espécies de *Legionella*, considera-se um caso provável de DL (Marques et al, 2003).

A deteção direta de antígenos e de ácidos nucleicos permite apenas concluir que se trata de um caso provável de DL. Estes métodos apresentam a vantagem de detetar as bactérias mesmo após o início da terapêutica e fornecer o resultado num prazo de, aproximadamente, 4 horas. A sensibilidade da primeira técnica varia entre 70 e 90%, e a sua especificidade é superior a 99%, mas apenas deteta *Lp* serogrupo 1 (Reller et al, 2003). A deteção de ácidos nucleicos, por PCR, pode ter como alvo o gene 16S, a região 23S-5S e o gene mip, sendo este último específico para *Legionella pneumophila* (Ballard et al, 2000). Em amostras respiratórias esta técnica tem uma especificidade $\geq 99\%$ e sensibilidade de 85%, em amostras de urina, soro ou leucócitos a sensibilidade é inferior, variando entre 30 e 86% (Avni et al, 2015). O facto de permitir o diagnóstico através de amostras não respiratórias é importante, uma vez que uma amostra de urina é muito mais fácil de obter. Outra vantagem desta técnica passa pelo seu potencial de detetar todas as espécies e serogrupos da espécie *Lp* e não necessitar de bactérias viáveis para ser realizado. Apesar das vantagens enumeradas o método ainda não está padronizado e por isso um caso de DL diagnosticado por PCR é designado como caso provável.

Hoje em dia existem novos métodos de diagnóstico que ainda não foram incluídos nos critérios laboratoriais para DL (UE, 2018), destacando-se entre outros, a LAMP (do inglês – *Loop-mediated Isothermal Amplification*), a cultura em amibas, o MALDI-TOF MS (do inglês – *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) e os TAC (do inglês – *Taqman array card*).

Na técnica LAMP, a amplificação e a detecção de oito regiões distintas são feitas apenas numa etapa, à temperatura constante de aproximadamente 63 °C. Os resultados são lidos com o auxílio de um turbidímetro e a turbidez relaciona-se com a quantidade de DNA sintetizado (Parida et al, 2008). De acordo com o artigo de Xi Lu esta técnica apresenta uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 100% para *Legionella* spp e para *Legionella pneumophila* (Lu et al, 2011).

MALDI-TOF MS é uma das técnicas atualmente mais utilizadas em laboratórios de microbiologia para a identificação de bactérias. Este método permite a identificação dos microrganismos recorrendo ao seu perfil proteico que é obtido através de uma ionização da amostra e de uma posterior separação dos iões com base na razão massa/carga. O perfil obtido é comparado com perfis existentes na base de dados (Singhal, 2015). Uma das vantagens é a quantidade mínima de células que são necessárias, sendo que o procedimento pode ser realizado apenas com uma colónia (Gaia et al, 2011).

Outra das mais recentes técnicas de diagnóstico são os TAC, que consistem na utilização de *cards* de microfluída onde se encontram inseridos os respetivos *primers* e as sondas liofilizados (Kodani et al, 2011; Steensels et al, 2015). Atualmente existem *cards* com a capacidade de detetar *Lp* ou outras espécies de *Legionella*, dependendo dos *primers* que são utilizados.

Relativamente à cultura em amibas, a equipa de Descours, em 2012, mostrou que a passagem prévia das amostras respiratórias por cultura de amibas aumenta a capacidade de recuperação da bactéria em BCYE. (Descours et al, 2012).

1.1.4. Terapêutica

Para uma terapêutica eficaz são necessários antibióticos que atinjam elevadas concentrações intracelulares, uma vez que esta bactéria se multiplica no interior dos macrófagos alveolares (Dunbar et al, 2004; Mou et al, 2018). Os antibióticos com maior eficácia para combater as infeções causadas por *Legionella* são a azitromicina (classe dos macrólidos) e a levofloxacina (classe das fluoroquinolonas) (Sabrià et al, 2005). Atualmente, são também indicados para estas infeções, antibióticos que aparentemente possuem uma maior biodisponibilidade, um maior período de semi-vida e uma melhor penetração nos macrófagos. Estes são a doxiciclina (classe das tetraciclinas) e a tigeciclina (classe das gliciliclinas) (Cunha et al, 2016).

1.1.5. Epidemiologia

A DL pode ocorrer sob a forma de surtos, sendo estes definidos pelo aparecimento de dois ou mais casos de infeção associados à mesma fonte e em que os sintomas surgem num curto período de tempo (CDC, 2018)

De todos os surtos ocorridos, destacam-se alguns pelo número de indivíduos afetados. Por ordem decrescente de número de doentes o maior foi o surto de Múrcia (Espanha) em 2001, logo a seguir o de Mançanares (Espanha) em 2015 e em terceiro lugar o de Vila Franca de Xira (Portugal) em 2014 (García-Fulgueiras et al, 2003; Shivaji et al, 2014; George et al, 2016; Cebrián et al, 2018).

Entre 26 de junho e 19 de julho de 2001 ocorreu, em Múrcia (Espanha), um dos maiores surtos de DL. A sua origem foi associada a uma torre de arrefecimento do sistema AVAC de um hospital. Foram reportados mais de 800 casos, dos quais 449 confirmados laboratorialmente, 74% dos doentes com casos confirmados necessitaram de internamento hospitalar. A taxa de mortalidade foi de 1,1% entre os casos confirmados (García-Fulgueiras et al, 2003).

Entre 19 de novembro de 2015 e 5 de janeiro de 2016, em Mançanares (Espanha), decorreu um outro surto. No total foram notificados 593 casos, dos quais 277 confirmados e 26 prováveis, tendo 36% dos casos confirmados necessitado de hospitalização e destes, 4 acabaram por falecer. Destacaram-se duas instalações como prováveis fontes da infeção, uma torre de arrefecimento e uma fonte ornamental (Cebrián et al, 2018)

O terceiro maior surto decorreu entre 14 de outubro e 2 de dezembro de 2014, em Vila Franca de Xira (Portugal) no qual foram afetados 403 indivíduos. Destes, 377 foram casos confirmados e 26 prováveis, tendo falecido 14 doentes, o que corresponde a uma taxa de mortalidade de 3,5%. A longa duração deste surto (50 dias) foi associada a fatores como temperaturas médias superiores a 20°C, circulação do vento reduzida, humidade relativa entre 80 e 90% e ainda o facto de existir uma elevada concentração de partículas suspensas na atmosfera vindas do deserto do *Saara*. Estas condições permitiram que a bactéria *Legionella*, proveniente de uma torre de arrefecimento, permanecesse viável e em suspensão por vários dias (Shivaji et al, 2014; George et al, 2016).

1.1.6. Controlo e prevenção

Dado que a bactéria se transmite por aerossóis, a prevenção da infeção consiste na diminuição da formação e da disseminação dos mesmos. Antes da instalação de equipamentos de transferência de calor associados a sistemas de aquecimento, ventilação e ar condicionado ou a unidades de tratamento do ar que possam gerar aerossóis de água, nomeadamente, torres de arrefecimento, condensadores vaporativos, sistemas de arrefecimento de água de processo industrial, sistemas de arrefecimento de cogeração e humidificadores, deve ser estudada a sua localização, tendo sempre em consideração os ventos predominantes da zona, de forma a diminuir a exposição das pessoas a aerossóis. Nas redes prediais de água quente e de água fria, o

desenvolvimento bacteriano pode ocorrer com facilidade devido ao inadequado teor de cloro e temperatura ou existir estagnação da água e nutrientes em circulação. Nestas instalações a temperatura da água fria deve estar sempre abaixo dos 20 °C, as tubagens da água quente e da água fria devem estar suficientemente afastadas e os depósitos de armazenamento de água quente devem manter a temperatura próxima dos 60 °C, de forma a que em qualquer ponto da rede a temperatura mínima seja de 55 °C (Benoliel et al, 2014).

Quando é detetada colonização por bactérias do género *Legionella*, devem ser tomadas medidas de desinfeção que podem ser por via química ou física.

Os processos químicos mais utilizados são hipoclorito de sódio e o dióxido de cloro, existindo outros métodos que também se podem utilizar tais como, os iões de cobre/prata e o ozono. Para o tratamento de choque, quando existem casos de DL associados a sistema prediais de água faz-se a hipercloração, submetendo o sistema a valores de 20-50 mg/L durante 1-2h para promover a destruição da *Legionella* e dos biofilmes. Após este processo os valores de cloro residual livre devem manter-se entre 0,5-1 mg/L, normalmente adicionando-se biodispersantes para garantir que o cloro atua a nível das bactérias livres e dos biofilmes. A utilização do dióxido de cloro, um gás solúvel na água composto por ácido hipoclorítico e cloreto de sódio, é mais eficaz que o cloro, uma vez que são necessárias doses mais baixas e consegue eliminar os biofilmes sem a utilização de biodispersantes.

Os processos físicos incluem a desinfeção térmica, que consiste no aumento da temperatura da água até aos 70 °C e na passagem da mesma pelos chuveiros e torneiras durante 30 minutos. Apesar deste método se mostrar eficaz na erradicação das bactérias presentes nas superfícies das tubagens, no entanto, se existirem biofilmes o método é pouco eficaz, uma vez que não tem capacidade de os eliminar. Dentro da desinfeção térmica existe ainda a utilização de vapor, ou seja, injeção de vapor produzido à temperatura de 100 °C nas tubagens da água quente. Nos processos físicos pode recorrer-se à desinfeção por ultravioleta (UV). Esta radiação atravessa a parede celular da bactéria e provoca alterações no DNA, impedindo a replicação bacteriana e consequentemente a morte. A técnica apresenta como principal vantagem o facto de não eliminar só as bactérias, mas também alguns protozoários, no entanto não remove os biofilmes e a sua eficácia diminui com o aumento da turvação da água (Diegues et al, 2013).

Segundo a Norma 024/2017, emitida após o surto no Hospital São Francisco Xavier, o órgão de gestão de cada hospital é responsável por garantir a prevenção e controlo da bactéria, assegurando a existência e o cumprimento de um plano que integre a avaliação de risco, a vigilância e a manutenção dos sistemas e equipamentos que gerem aerossóis. A 20 de Agosto de 2018 foi publicada a Lei n.º 52/2018 que estabelece o regime de prevenção e controlo da Doença dos Legionários, enunciando os procedimentos relativos à manutenção de todos os equipamentos propícios, à disseminação da *Legionella* e estabelece as condições para a conceção de uma estratégia de prevenção e controlo no caso da existência de casos de DL.

1.2. *Legionella pneumophila*

1.2.1. Características gerais

As bactérias do género *Legionella* são bacilos Gram negativos que medem entre 0,3 a 0,9 µm de largura e entre 2 a 20 µm de comprimento, são aeróbias e não formadoras de esporos. Possuem pleomorfismo, sendo este influenciado pela temperatura, pela disponibilidade de nutrientes e pelo ambiente de crescimento (por exemplo, o interior de amibas). Para a sua cultura em laboratório é necessário a utilização de meio específico, como referido em 1.1.3. (Diederer et al, 2008; Mercante et al, 2015). A espécie *Lp* é o agente causador de pelo menos 90% dos casos de DL (Muder et al, 2002). Baseado em estudos de hibridização DNA-DNA a espécie *Lp* é subdividida em três subespécies, *pneumophila*, *fraseri* e *pascullei*. A subespécie *pneumophila* é a mais frequentemente associada a surtos e subdivide-se em 15 serogrupos. A estirpe tipo desta subespécie é a Philadelphia 1, e foi isolada de tecido pulmonar humano do surto de 1976, apresenta um teor de G + C de 39 mol%. A subespécie *fraseri* é encontrada apenas nos serogrupos 1, 4, 5 e 15. Enquanto a subespécie *pascullei* é raramente encontrada e está representada apenas no serogrupo 5 (Brenner et al, 1988; Ko et al, 2003).

1.2.2. Ciclo de Vida

Como referido anteriormente, esta bactéria é encontrada em ambientes de água doce, onde vive em “vida livre” ou associada a biofilmes (Hilbi et al, 2011). A bactéria replica-se no interior de protozoários, incluindo diversos géneros de amibas, como *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Hartmannella* e algumas espécies de ciliados (Lau et al, 2009). Os protozoários são essenciais não só no crescimento da *Legionella*, mas também se coloca a hipótese de terem originado um *pool* de características de virulência que permitem à *Legionella* infetar células humanas, especificamente os monócitos e os macrófagos alveolares (Steinert et al, 2002). A bactéria coloniza ambientes criados pelo Homem, tais como chuveiros, canalizações, torres de arrefecimento (Hilbi et al, 2011), banheiras de hidromassagem, equipamentos industriais e aparelhos respiratórios (Benoliel et al, 2014). Sabe-se ainda que a *Legionella* consegue resistir a temperaturas de 50°C por várias horas e a maioria das espécies não se multiplica a temperaturas inferiores a 20°C (Cunha et al, 2016; Bartram et al, 2007). Apesar da temperatura ótima para o seu crescimento variar entre os 20 e os 45°C (Diederer et al, 2008), descobriu-se que esta consegue colonizar habitats extremos como ambientes ácidos e águas que atingem temperaturas superiores a 60°C (Sheehan et al, 2005). Um estudo conduzido por Veríssimo, em 1991, encontrou *Legionella* nas áreas hidrotermais da Ilha de São Miguel, Açores e em 1993, Marrão e a sua equipa, encontraram também a bactéria em duas áreas termais de Portugal e numa nos Estados Unidos da América (Marrão et al, 1993; Veríssimo et al, 1991). Para além da sua capacidade de sobreviver em altas temperaturas, a bactéria tem a capacidade de se multiplicar em lagos na Antártica onde as temperaturas podem rondar os 0°C (Carvalho et al, 2008).

Estudos mostram que *Lp* apresenta um ciclo de vida bifásico, alternando entre uma fase replicativa e uma fase transmissiva (Diederer et al, 2008; Mercante et al, 2015; Molofsky et al, 2004). Existem grandes diferenças entre estas duas fases, tanto a nível de expressão de genes como a nível morfológico. Na fase replicativa as bactérias apresentam-se como bacilos delgados, não móveis e com a parede celular ondulada, sendo que na fase transmissiva se transformam em bacilos mais curtos, móveis (presença de um ou mais flagelos polares ou subpolares) com uma parede celular espessa e lisa (Faulkner et al, 2002). Na primeira fase do ciclo, o hospedeiro internaliza *Lp* por um processo denominado “*Coiling phagocytosis*”. Nesta fase é necessária a expressão de diversas proteínas bacterianas como a RtxA, proteína de formação de poros, a MOMP, proteína principal da membrana externa, a Hsp60, uma proteína de choque térmico e ainda a PilEL, a EnhC e a LadC (Escoll et al, 2013). O processo de “*coiling phagocytosis*” foi descrito pela primeira vez em 1998 por Rittig e a sua equipa, onde relataram um processo de fagocitose que consiste no enrolamento assimétrico das bactérias por pseudopodes unilaterais, que no caso específico da *Legionella* é apenas um pseudopode que se enrola em espiral e se internaliza (Figura 2) (Rittig et al, 1998).

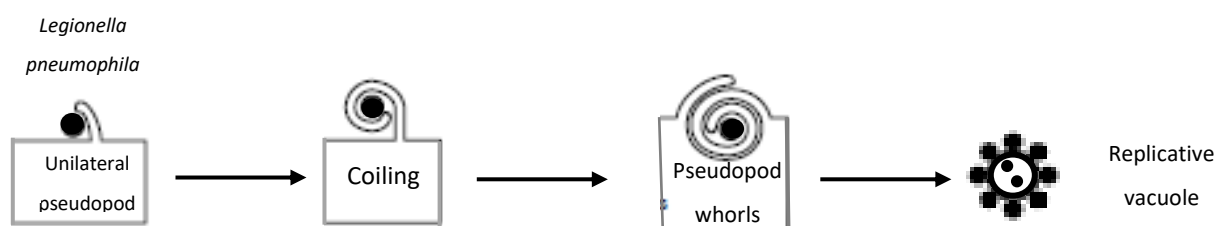


Figura 2 - Processo de internalização da *Lp* por “*coiling phagocytosis*”. (Adaptado de Rittig et al, 1998)

Após estar internalizada é necessário o sistema de secreção tipo IV (T4SS), denominado Icm|Dot (multiplicação intracelular|defeituosa para transporte de organelos) para que ocorra a formação do vacúolo que contém a *Legionella* (LCV) (Finsel et al, 2015). Depois de se formar o LCV ocorre o recrutamento de vesículas de retículo endoplasmático e de mitocôndrias que vão rodear o vacúolo impedindo a sua degradação (Tilney et al, 2001). Neste ponto do ciclo, a *Legionella* encontra-se na fase replicativa do seu ciclo, ou seja, está em multiplicação dentro do LCV. São expressos genes como *csrA*, que reprime a expressão das características transmissivas e ainda genes como, o *letA* e *mip*. Este último foi o primeiro gene a ser relacionado com a patogenicidade da bactéria, tanto em protozoários como em mamíferos, uma vez que é essencial para que ocorra uma infeção eficiente, pois altera o circuito normal da célula fagocítica e promove a multiplicação intracelular (Brüggemann et al, 2006; Einsenreich et al, 2016; Fields et al, 2002). Quando a concentração de nutrientes começa a diminuir, RelA promove a síntese de ppGpp, um regulador de diversos genes responsáveis pela transição para a fase transmissiva (Richard et al, 2013; Steinert et al, 2007). A passagem para a fase transmissiva é fortemente induzida pelo gene *enhA* (Brüggemann et al, 2006). Ao

entrarem nesta fase as bactérias vão expressar, coordenadamente, um indutor de necrose fagocitária, motilidade, resistência à luz UV, ao calor, à pressão osmótica e à limitação de nutrientes (Molofsky et al, 2004). Posteriormente as MIF's (do inglês – *mature intracellular form*), que são altamente infecciosas e móveis, migram para o citosol onde se multiplicam com grande intensidade. Por fim, as bactérias são libertadas para o meio extracelular por necrose celular e estão prontas para reinfetar um novo hospedeiro (Eisenreich et al, 2016; Molofsky et al, 2004).

Durante o ciclo de vida é também importante, para a replicação intracelular, a presença de um outro sistema de secreção de tipo II, denominado T2S. A este sistema de secreção estão associados dois processos, primeiro a translocação de proteínas, por via Sec ou Tat, através da membrana interna das bactérias e de seguida o transporte de proteínas do periplasma para o exterior através de uma secretina da membrana externa (Shin et al, 2008).

1.2.3. Estudo da expressão génica

A análise da expressão génica consiste na determinação dos genes expressos ao nível da transcrição genética. Esta é feita através da quantificação de RNA, uma vez que quando há expressão dos genes, por transcrição são produzidas muitas cópias de RNA mensageiro (mRNA) correspondentes. O mRNA é uma molécula intermediária que transporta a informação genética do núcleo da célula para o citoplasma onde posteriormente são sintetizadas as proteínas, através do processo de tradução. Globalmente, para esta análise são utilizados os *Microarrays*, o *RNA Sequencing* (RNA-Seq) e a PCR em tempo real (qPCR) (Govindarajan et al, 2012; Lovén et al, 2012; Wong et al, 2005).

A tecnologia de *microarrays* consistem na imobilização de sequências específicas na superfície de uma lâmina que posteriormente vão reagir com o cDNA previamente marcado com corantes fluorescentes (Cy3 e Cy5), no final a lâmina é submetida a um *scanner* conectado a um software específico que analisa os dados e quantifica a intensidade da fluorescência em cada ponto (Guindalini et al, 2007)

A técnica RNA-seq, utiliza o sequenciamento de alto rendimento dos mRNAs ou cDNAs com o principal objetivo de compreender o transcritoma de diferentes organismos (Nagalakshmi et al, 2010). Esta metodologia permite obter com mais segurança medidas de quantificação, perfil e orientação dos transcritos, quando comparada com técnicas como os *microarrays*, por exemplo.

Para qualquer uma das técnicas acima enumeradas é extraído o RNA, uma vez que é uma molécula instável são necessários alguns cuidados de forma a que não se degrade. É recomendada a utilização de pontas com filtro e tubos livres de RNases, o material (pipetas, suportes, bancada) deve ser limpo com produtos que degradem as RNases (ex., RNaseZap), é ainda recomendada a utilização de luvas uma vez que a pele possui

grandes quantidades de RNAses. Um outro cuidado importante durante o processo de extração é realizar as agitações com a mão e não com o vórtex.

Atualmente, existem diversos estudos sobre o transcrito da espécie *Legionella*. Em 2007, Hindré e a sua equipa realizaram um estudo onde analisaram o transcrito das bactérias sésseis que constituem os biofilmes concluindo que a expressão génica destas se assemelha à fase replicativa, estudaram ainda a influência do ferro na formação de biofilmes observando que a sua formação era inibida em condições ricas em ferro (Hindré et al, 2008). Em 2010, uma equipa do Instituto Pasteur, Paris, estudou quais os genes envolvidos na síntese do flagelo e como ocorre a sua regulação (Albert-Weissenberger et al, 2010). Faucher e a sua equipa, em 2011, desenvolveram um estudo que tinha como objetivo analisar o perfil génico da *Lp* durante a multiplicação intracelular em macrófagos humanos e compara-lo com o perfil obtido durante o crescimento exponencial em meio rico (AYE) (Faucher et al, 2011). Foi também realizado um outro estudo para a determinar se a resposta transcricional dos macrófagos infetados por *Lp* era dependente da proliferação intravacuolar, para tal foi utilizada uma estirpe selvagem e um mutante ankB sem capacidade de se replicar intracelularmente. O estudo mostrou que apesar de a estirpe mutante não se replicar, transloca para o citoplasma os mesmos efetores que a estirpe selvagem, e que a resposta transcricional dos macrófagos é semelhante em ambos os casos (Price et al, 2014). Em 2015, um grupo no Canada estudou a expressão génica da bactéria em diferentes meios de crescimento, detetando que alguns genes parecem ser essenciais para o crescimento da *Lp* na água (Li et al, 2015). Sahr e os seus colegas, em 2017, desenvolveram um estudo para determinar quais os mecanismos que são controlados pelo gene *csrA* (Sahr et al, 2017). Mais recentemente, em 2018, um estudo mostrou a existência de diferenças no padrão de expressão dos genes da *Lp* envolvidos na morte de diferentes hospedeiros (macrófagos THP-1 e *A. castellanii*) (Mou et al., 2018) e um outro, verificou que a passagem previa por *Acanthamoeba* induzia o aumento da expressão de alguns fatores de virulência e que isso ativava mecanismos que favoreciam a sobrevivência da bactéria contra respostas imunes (Gomes et al., 2018).

1.2.3.1. PCR em tempo real

A PCR em tempo real (qPCR), tem como base a capacidade da DNA polimerase de sintetizar uma nova cadeia de DNA complementar à cadeia molde (Mullis, 1986). A grande diferença entre a qPCR e a PCR convencional é que na primeira realiza-se amplificação e a deteção do produto em simultâneo, deixando de existir a necessidade de manipular os produtos amplificados para a visualização dos resultados (Higuchi, 1993). Em comparação com os outros métodos que permitem o estudo da expressão génica, este oferece várias vantagens, incluindo a pequena quantidade de amostra necessária para a análise, a capacidade de permitir analisar mais do que um gene em simultâneo e a sua rapidez (Gallagher et al, 2010).

Os resultados da qPCR são obtidos com base na detecção de um sinal fluorescente emitido por sondas de hidrólise ou por fluoróforos intercalantes, como o *SYBR Green* (Arya et al, 2005).

As sondas de hidrólise, como a TaqMan, estão duplamente marcadas, numa extremidade com um fluoróforo, designado repórter e na outra com um *quencher*, o silenciador. A emissão de fluorescência ocorre quando há excitação do repórter, através da absorção de comprimentos de onda específicos. No momento em que a sonda TaqMan se liga ao produto amplificado, ocorre a clivagem da sonda, separando o repórter do *quencher* o que permite a emissão da fluorescência que vai ser detetada pelo equipamento (Gallagher et al, 2010).

O *SYBR Green* intercala-se em todas as moléculas de DNA que apresentem cadeia dupla, emitindo um sinal fluorescente que permite monitorizar a amplificação do gene alvo que é desencadeada por iniciadores específicos (*primers*). A intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de novas cadeias formadas. Dada a inespecificidade da ligação do SYBR Green existe a hipótese de ocorrerem falsos positivos se existir a formação de dímeros de *primers*. Assim, é necessário garantir a especificidade da reação e para tal, devem ser analisadas as curvas de dissociação onde é verificada a presença de produtos de PCR de diferentes tamanhos (Wong et al, 2005).

Para a análise dos resultados da qPCR, é necessário ter em consideração três conceitos: *baseline*, *threshold* e *threshold cycle*. *Baseline* refere-se aos ciclos iniciais, onde há emissão de fluorescência normalmente associada aos reagentes, o sinal emitido é considerado “ruído de fundo” (Morgante et al, 2016). *Threshold* é uma linha ajustável que permite diferenciar a fluorescência do ruído de fundo da fluorescência da amplificação das amostras. O ponto em que a fluorescência emitida pela amostra interceta a linha de *threshold* é designado Ct (*Threshold cycle*), ou seja, indica o número de ciclos necessários para que a amplificação do gene alvo seja diferenciada do ruído de fundo (Nascimento et al, 2010). O número do Ct obtido é inversamente proporcional ao número de cópias do DNA, ou seja, quanto menor o Ct obtido maior a carga da amostra.

A qPCR permite dois tipos de quantificação, absoluta e relativa. Na quantificação absoluta o resultado indica-nos o número de cópias do fragmento alvo presente na amostra em análise. Na quantificação relativa é possível quantificar os diferentes níveis de expressão de um gene alvo em relação à sua expressão na amostra inicial ou calibradora. Os resultados da qPCR são normalizados utilizando um gene, referido como controlo endógeno ou gene de referência (Arya et al, 2005).

Os genes de referência mantêm uma expressão constante entre todas as amostras do estudo, isto é, não sofre alterações em função das condições experimentais (VanGuilder et al, 2008).

Existem dois métodos de quantificação relativa, o método da curva padrão relativa e o método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). No método comparativo, a diferença de expressão relativa do RNAm é calculada através da expressão $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra\ teste} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$, onde o ΔCt é a subtração entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene de referência (Arya et al, 2005).

1.3. Objetivos

As bactérias do género *Legionella* têm sido alvo de vários estudos, no entanto, a interação *Lp-Ac* tem sido pouco investigada. Atualmente, tem vindo a aumentar a percepção de que esta interação é essencial para compreender a patogénese da bactéria, possibilitando a pesquisa de novos alvos terapêuticos e de substâncias químicas, mais específicas e com maior capacidade para a eliminarem do meio ambiente.

O presente estudo teve como objetivos:

- Investigar a capacidade de internalização da estirpe ST1905 pela *Acanthamoeba castellanii* e a taxa de multiplicação intracelular da estirpe ST1905
- Determinar o tempo de duplicação da estirpe ST1905 em cultura líquida (AYE) e o seu tempo de viabilidade em água potável
- Estudar o transcrito desta estirpe de *Lp* subespécie *fraseri* (ST1905) após co-cultura em *Acanthamoeba castellanii*, utilizando a técnica de qPCR para analisar genes anteriormente selecionados
- Comparar os resultados da estirpe ST1905 com os obtidos com a estirpe ST1 em trabalho anteriormente realizado no laboratório.

2. Material e Métodos

Todos os métodos descritos foram realizados com base nas boas práticas laboratoriais, utilizando material estéril, livre de DNases e RNases e, sempre que possível, material descartável. Os ensaios de co-cultura e a manipulação das culturas de *Acanthamoeba castellanii* foram efetuados na sala de culturas de células e em câmara de fluxo laminar Classe II (Nuaire).

Ao longo do presente estudo, o trabalho desenvolvido seguiu os protocolos previamente estabelecidos no laboratório, no entanto, em alguns deles foi necessário efetuar alterações, porque a estirpe bacteriana utilizada era diferente e foi pela primeira vez testada.

O estudo envolveu diferentes protocolos e métodos:

- Material Biológico:
 - Bactéria
 - *Legionella pneumophila* (Lp) sg1, genótipo ST 1905
 - Conservada no laboratório em meio de tioglicolato com 15% de glicerol, -80 °C
 - Culturas em meio sólido BCYE- α e meio líquido AYE
 - Amibas
 - *Acanthamoeba castellanii* (Ac), estirpe Neff ATCC 30010
 - Conservada no laboratório em meio de *dimethyl sulfoxide* (DMSO) com 90% de soro de boi fetal, -80 °C
 - Descongelamento e estabilização da cultura
 - Subculturas em meio de multiplicação
- Procedimentos:
 - Morfologia da estirpe ST1905
 - Teste de viabilidade da estirpe ST1905
 - Quantificação de suspensão para os ciclos de co-cultura
 - Preparação da cultura em meio AYE para o estudo da expressão génica
 - Determinação do tempo de duplicação em meio AYE
 - Ciclos de co-cultura *Legionella-Acanthamoeba* (Lp-Ac)
 - Estudo da replicação intracelular (bactérias provenientes de meio BCYE- α)
 - Quantificação de amibas
 - Preparação da suspensão bacteriana
 - Ensaio de co-cultura Lp-Ac
 - Recolha de bactérias internalizadas pelas amibas (0h)

- Recolha de bactérias extracelulares após o ciclo de co-cultura (24h)
- Estudo da expressão génica (bactérias provenientes de meio AYE)
 - Quantificação de amibas
 - Preparação da suspensão bacteriana
 - Recolha da amostra calibradora
 - Ensaio de co-cultura Lp-Ac
 - Recolha das bactérias extracelulares após o ciclo de co-cultura (amostra teste, 24h)
- Quantificação da replicação intracelular
 - Internalização (cálculo das *Lp* internalizadas pelas amibas – 0h)
 - Multiplicação (cálculo das *Lp* extracelulares – 24h)
- Estudo da expressão génica
 - Extração do RNA da amostra calibradora e da amostra teste
 - Tratamento com DNase
 - Síntese do cDNA
 - PCR em tempo real

2.1. Material biológico

2.1.1. *Legionella pneumophila*

Para a realização deste estudo foi utilizada *Legionella pneumophila* subespécie *fraseri*, serogrupo 1, genótipo ST1905, isolado clínico do surto ocorrido em Vila Franca de Xira, em 2014. Isolado enviado para o laboratório da UC Infecção para tipificação ao abrigo do Programa de Vigilância Integrada da Doença do Legionários, da Direção-Geral de Saúde. Esta encontrava-se conservada em meio de tioglicolato com 15% de glicerol (Anexo IA), a -80 °C.

Para garantir a estabilização da cultura, após a descongelação, foram realizadas duas subculturas em meio de BCYE- α a 37 °C antes de iniciar a sua utilização.

Ao longo do estudo foram utilizados dois meios para o crescimento da bactéria, o meio sólido (BCYE- α) e meio líquido (AYE). Os meios foram preparados no laboratório (Anexo IB e IC), o meio BCYE- α foi autoclavado (20 minutos a 120 °C) e o meio AYE foi filtrado com um filtro de 0,22 μ m utilizando uma bomba de vácuo.

2.1.2. *Acanthamoeba castellanii*

Neste estudo foi utilizada *Acanthamoeba castellanii* estirpe Neff ATCC 30010, congelada a -80 °C em meio de dimetilsulfóxido (DMSO) com 90% de soro de boi fetal. Após rápida descongelação (Anexo II) e lavagens para retirar o meio de congelação foi colocada em frascos de 25 cm² com meio de multiplicação (PYG) (Anexo ID), meio com peptona, extrato de levedura e açúcares, para estabilização e obtenção de culturas confluentes.

Durante todo o estudo foi essencial manter a cultura viável, pelo que foi necessário realizar subculturas sempre que os frascos apresentavam uma monocamada confluyente, isto é, aproximadamente de 2 em 2 dias.

2.2. Procedimentos

2.2.1. Morfologia da estirpe ST1905

Foi efetuada uma coloração pelo método Gram (Anexo III), com o intuito de observar a morfologia da estirpe em estudo (ST1905) e compará-la com a da estirpe Paris (ST1), estudada anteriormente no laboratório. As colorações foram realizadas partindo de suspensões com a mesma densidade ótica (DO) e com culturas com o mesmo tempo de incubação.

2.2.2. Teste de viabilidade

O teste de viabilidade foi realizado para a estirpe em estudo e, para termo de comparação, foi também efetuado para a estirpe Paris.

Colocou-se 10 mL de água em tubos de 15 mL estéreis e inocularam-se com as respetivas estirpes de modo a obter uma DO de 0,5 a 550 nm. Para a realização dos testes utilizou-se água da torneira esterilizada com o objetivo de manter a bactéria em contacto com concentrações de iões e minerais habituais. De forma a mimetizar as condições de crescimento nas canalizações os tubos de 15 mL onde se inoculou a bactéria foram revestidos com papel de alumínio e colocados à temperatura ambiente.

Inicialmente foram recolhidas amostras semanalmente (durante o primeiro mês) e posteriormente uma vez por mês. O conteúdo recolhido era plaqueado de acordo com a técnica de Miles e Misra (Figura 3).

2.2.3. Quantificação de suspensão para os ensaios de co-cultura

Foi efetuada uma suspensão de *Legionella* em água estéril com uma densidade ótica (DO) a 550 nm, de 0,5. A bactéria utilizada foi recolhida de uma cultura em BCYE- α com 24h de incubação a 37 °C. Foram plaqueadas diluições sucessivas de 10 vezes utilizando a técnica de Miles e Misra (Figura 3). Em cada placa de BCYE- α plaqueou-se quatro diluições em triplicado, isto é, três gotas de 30 μ L, de cada diluição. A contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) foi efetuada após 3 a 5 dias de incubação a 37 °C e as UFC/mL foram calculadas utilizando a diluição em que a contagem se situou entre 3 e 30 UFC, através da seguinte fórmula:

$$UFC/mL = \frac{\overline{UFC/gota} \times 10^3}{30} \times \frac{1}{diluição}$$

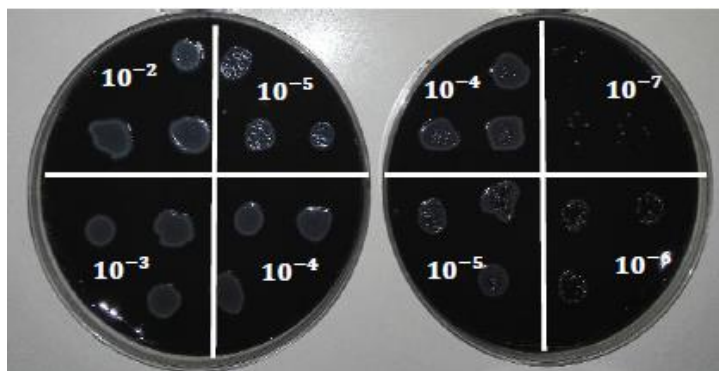


Figura 3 - Técnica de Miles e Misra (Fotografia obtida durante a presente tese)

2.2.4. Preparação da cultura em meio AYE para o estudo da expressão génica

A cultura líquida foi realizada num *erlenmeyer* de 250 mL a 37 °C e com agitação de 170 rotações por minuto (rpm) (agitador orbital OVAN) utilizando 100 mL de meio AYE inoculado com cultura pura de *Lp* proveniente de BCYE- α com 24h de incubação, a 37 °C. A curva de crescimento foi monitorizada, hora a hora, pela leitura da DO a 550 nm até atingir a fase estacionária. A ausência de contaminação da cultura líquida foi confirmada pela observação ao microscópio ótico (Zeiss) com a objetiva de 100x, de uma preparação da cultura entre lâmina e lamela.

2.2.5. Determinação do tempo de duplicação

O tempo de duplicação da *Lp*, ST 1905, foi calculado utilizando os valores de DO obtidos durante a curva de crescimento da cultura. Durante toda a fase exponencial da cultura, de hora a hora foram recolhidas amostras a partir das quais era feita a técnica de Miles e Misra. Com os resultados obtidos nas contagens foi calculado o tempo de duplicação (tg) e o número de gerações (n) recorrendo às seguintes equações:

$$n = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2} \quad tg = t/n$$

n = Número de gerações no período de tempo em análise

N = Número de bactérias no final do período em análise

N₀ = Número de bactérias no início do período em análise

tg = Tempo de duplicação

t = Período de tempo em análise

2.2.6. Ciclos de co-cultura

2.2.6.1. Protocolo para o estudo da replicação intracelular

Os ensaios referentes ao estudo da replicação intracelular foram realizados com o objetivo de quantificar as bactérias que foram internalizadas às 0h de infeção, isto é, após 1 hora de contacto, e a taxa de replicação no interior das amibas após 24h de co-cultura (Figura 4). Ambas foram efetuadas em dois poços em simultâneo.

Todos os ensaios de co-cultura foram realizados utilizando suspensões bacterianas com DO_{550nm} de 0,5 e culturas de amibas em meio pobre em nutrientes para potenciar a internalização, isto é, meio de infeção (MI) (Anexo IE), e utilizando uma concentração de 1,5 a 3,0x10⁵ Ac/mL. Como referido anteriormente, as bactérias utilizadas nestes ensaios provieram de cultura pura em BCYE-α, com 24h de incubação a 37 °C.

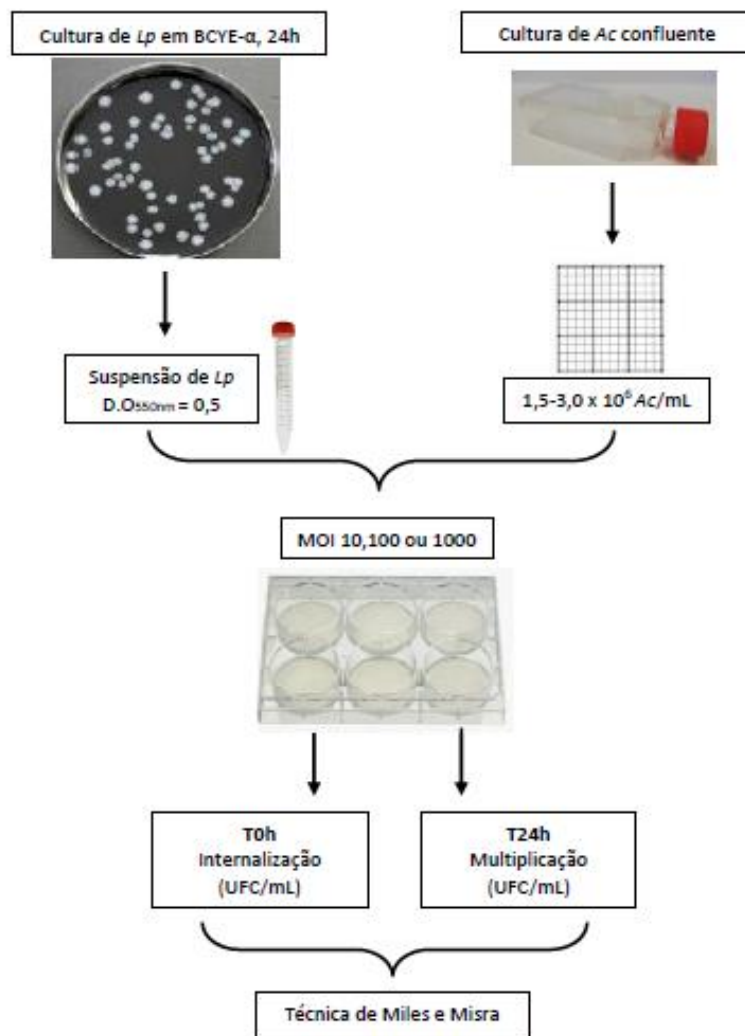


Figura 4 - Fluxograma do ciclo de co-cultura para o estudo da replicação intracelular

As amibas utilizadas foram recolhidas de culturas com 48h de incubação após a última subcultura e apresentando uma monocamada confluyente (Figura 5).

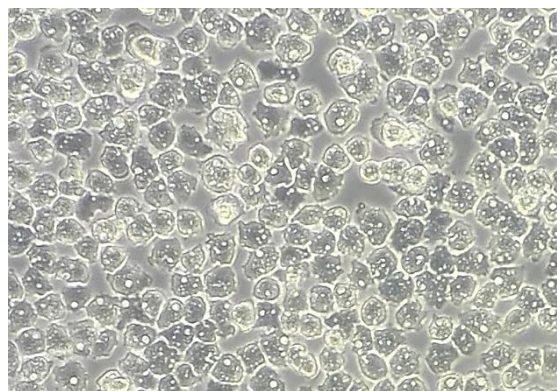


Figura 5 - Camada confluyente de *Acanthamoeba castellanii* aderidas ao fundo do frasco (Fotografia obtida durante a presente tese)

No processo de recolha o primeiro passo consistiu em duas a três lavagens com MI para arrastamento das amibas em suspensão (não viáveis), o sucesso desta etapa foi avaliado ao microscópio invertido (MEIJI Techno) com a objetiva de 40x. De seguida, destacou-se a camada confluenta com o auxílio de raspador (Orange Scientific). Por fim procedeu-se à contagem das amibas ao microscópio ótico na objetiva de 40x com o auxílio da câmara de Thomas.

Os ensaios foram realizados em placas de seis poços (SARSTEDT), utilizando um volume final de 3 mL por poço. Foi utilizado o MOI (*Multiplicity of Infection*) de 10,100 e 1000, isto é, 10,100 e 1000 *Lp* para uma *Ac*, respetivamente. Em cada série foram utilizados dois poços como controlo negativo, contendo apenas *Ac* e MI.

Após a preparação dos poços para o ensaio da replicação intracelular, junção das amibas e das bactérias, decorreu um período de contacto de 1h a 37 °C. De seguida, realizaram-se quatro a cinco lavagens para remover as amibas que não aderiram ao fundo do poço e as bactérias que não foram internalizadas. Após este passo iniciou-se a infeção, T0h.

No tempo T0h, os dois poços referentes ao ensaio da internalização foram raspados e de cada um foi recolhido 1 mL da suspensão celular para microtubos. De seguida, agitaram-se os microtubos no vórtex durante 1 minuto à sua velocidade máxima, centrifugaram-se 5 minutos a 19000 g e repetiu-se o processo de agitação. Por último, para assegurar a lise de todas as amibas, a suspensão foi passada três vezes por uma agulha de calibre 27 G.

Para a quantificação foi utilizada a técnica de Miles e Misra, descrita anteriormente.

Ao fim de 24h de infeção (T24h) quando, ao microscópio invertido com a objetiva de 40x, aproximadamente 90% das amibas já se encontravam lisadas e se observavam bactérias extracelulares com morfologia de pequenos bacilos muito agitados efetuou-se a recolha do conteúdo dos poços referentes ao ensaio de multiplicação. Foi realizado o protocolo de lise idêntico ao realizado para o T0h.

A taxa de multiplicação foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$T24h = \text{Log}_{10} \frac{\text{UFC/mL do lisado de AC após 24h de co - cultura}}{\text{UFC/mL do lisado de AC após período de contato com Lp}} \times 100$$

2.2.6.2. Protocolo para o estudo da expressão génica

Para o estudo da expressão génica foi importante garantir que todas as bactérias utilizadas para os ciclos de infeção se encontravam na fase estacionária, pelo que foi utilizada a cultura em meio AYE (meio líquido).

Considerou-se que a cultura estava em fase estacionária quando em três leituras consecutivas de DO_{550nm} existia uma diferença, aproximadamente, de 0,05.

Neste ponto recolheram-se 5 mL da cultura que foram imediatamente colocados em gelo. Para a obtenção do *pellet*, centrifugou-se a cultura durante 5 minutos, a 10000 rpm, a 4 °C. Este *pellet* funcionou como amostra calibradora. Os *pellets* foram guardados a -80 °C até ao seu processamento.

Em simultâneo, para realizar a co-cultura, foram recolhidos mais 5 mL da cultura que se centrifugaram durante 15 minutos a 4000 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação o *pellet* foi resuspenso em meio de infeção de modo a obter uma suspensão bacteriana com uma DO_{550nm} de 0,5.

Para o estudo da expressão génica o procedimento de recolha e contagem das amibas foi igual ao referido anteriormente para o estudo da replicação intracelular, alterando apenas a concentração de amibas utilizada para $4,0-8,0 \times 10^6$ Ac/mL.

Os ciclos de infeção para o estudo da expressão génica foram realizados em frascos de 25 cm³, num volume final de 6 mL de MI por frasco com um MOI de 1000 (Figura 6).

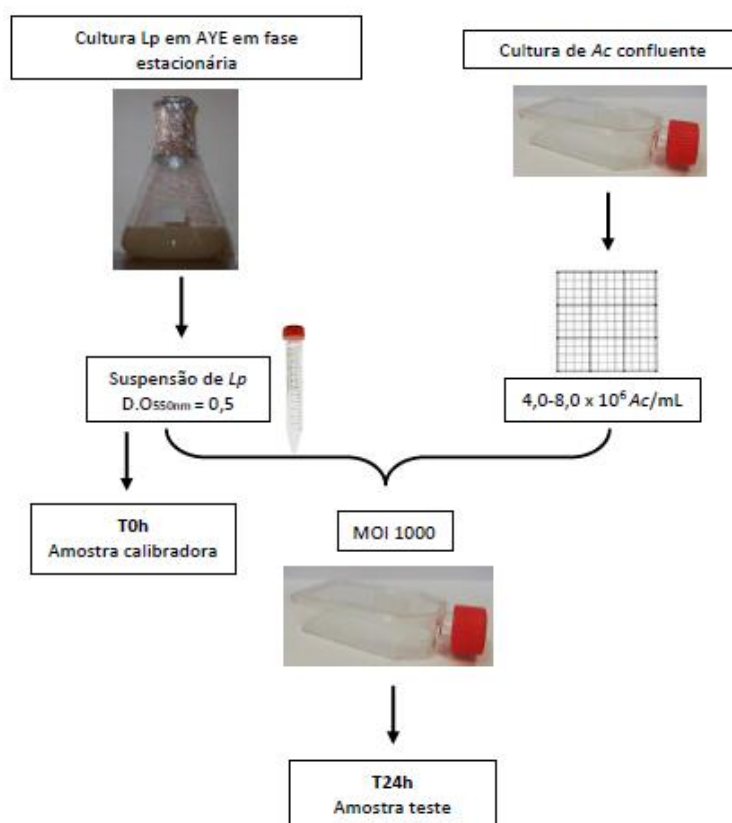


Figura 6 - Fluxograma do ciclo de co-cultura para o estudo da expressão génica

A amostra teste foi recolhida após 24 horas de co-cultura, quando se observou a lise de aproximadamente 90% das amibas e, consequentemente, muitas bactérias extracelulares. Nestas condições o frasco foi raspado e todo o conteúdo foi recolhido para *ependorfs* de 2 mL que foram imediatamente colocados em gelo e centrifugados nas condições anteriormente descritas para a amostra calibradora.

2.2.7. Estudo da expressão génica

2.2.7.1. Extração do RNA, tratamento com DNase e síntese do cDNA

O processo de extração do RNA foi composto pela junção de duas técnicas, extração manual com trizol e purificação por coluna, de modo a aumentar o rendimento do procedimento. No primeiro passo foi adicionado 1mL de trizol (Invitrogen) às amostras em estudo, de seguida a mistura foi homogeneizada com o auxílio da micropipeta para facilitar o processo de lise de todas as células. Após a lise das células adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Applichem) homogeneizou-se, agitando manualmente, centrifugou-se durante 15 minutos, a 12000 g, a 4 °C, no fim, observou-se a formação de três fases diferentes (fase aquosa, interface e fase orgânica). Procedeu-se à recolha da fase aquosa, onde se encontrava o RNA de interesse. De seguida, adicionou-se igual volume em Etanol a 70% (Panreac). Iniciou-se neste ponto a purificação por coluna com o kit comercial *PureLink™ RNA Mini kit* (Invitrogen), cujo procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. O princípio desta técnica baseia-se na ligação do RNA, que tem carga negativa, à coluna composta por sílica que tem carga positiva. No final de todo o procedimento foi adicionado um tampão de eluição, neste caso água, que perturbou a afinidade da coluna com o RNA permitindo que este passasse através dos poros.

O extrato foi depois submetido a um tratamento com DNase, para garantir que todo o DNA genómico foi eliminado. Utilizou-se o kit *TURBO DNA-free™ Kit* (Invitrogen), tendo-se efetuado dois ciclos de incubação de 30 minutos adicionando 1,5 µL de *Turbo DNase* no início de cada um, em vez de penas um ciclo como era recomendado pelo fabricante, o restante protocolo foi feito de acordo com as recomendações do fabricante.

Por fim, para a síntese do cDNA foi utilizado o *SuperScript III kit* (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante, no entanto, para aumentar o rendimento do processo adicionou-se o hexaprimer *p(dN)6* (Roche).

2.2.8. PCR em tempo real

Para o estudo da expressão génica foram utilizados os 13 genes (Tabela 1) anteriormente estudados no laboratório para estirpe Paris (ST1), com base nas maiores alterações na expressão do RNAm obtidas pela tecnologia de *microarrays* (Chasqueira, 2017). Todos os *primers* foram avaliados através de qPCR utilizando DNA de *Legionella* ST1905 proveniente de uma cultura pura para confirmar a presença dos genes respetivos no genoma desta estirpe.

Tabela 1 - *Primers* selecionados para a avaliação da expressão gênica da *Lp* estirpe *fraseri* por qPCR.

Genes	Primers	Sequências (5'-3')
lpp0094	lpp0094F	TAATCCTCTGGTGGGCTCGA
	lpp0094R	TTTCCACATCGGTGATACGAAC
lpp0845	lpp0845F	TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT
	lpp0845R	CAGATTCTTTTCTTGTTGTATGCG
lpp0972	lpp0972F	CCTGAGAAAAGACAGGCCACA
	lpp0972R	GTCTGCCAACGTCCTCACAA
lpp1170	lpp1170	ATTGAAGCGCTGCATACCCT
	lpp1170	TTATTAGCGCCTGCATGCAC
lpp1315	lpp1315F	TTAGAAAAGCAGCACCCCTTGG
	lpp1315R	AAGGCTAATCACAACGTTTTTGG
lpp1316	lpp1316F	CGGATGAAGCCCGTAAAGTC
	lpp1316R	TTGGAACAGGATTGCTTGTAGGT
lpp1340	lpp1340F	ATCCAATGCTGAGGACACAGC
	lpp1340R	GTCACGCATTGTTTCATAAGTCA
lpp1612b	lpp1612bF	CGATGATGCTGTGATTCCACA
	lpp1612b	CAACCCTGGTTTCGCAAGAG
lpp1900	lpp1900F	ACAGATGCTATAGGCGGGTATTG
	lpp1900R	GCCCATGACGGGTATGTTTC
lpp2607	lpp2607F	TACAACGCGGTAACGAAGGAT
	lpp2607R	GCCATGTCTTTGCCTAACCGT
lpp2694	lpp2694F	CTATAGGCAGAGGCGGTGCA
	lpp2694R	TCGTTTAACCACTTGGCATCCT
gyrA*	gyrAF	ATGCTATGCTCCCTGTCCGT
	gyrAR	GACTCCGACGAGGCTGTCAT
lpp3004*	lpp3004F	GAGCGGATGGAAGTGGTGAT
	lpp3004R	ATTTGATTCCGCCACATTG

*Genes de referência

A qPCR foi realizada no aparelho *7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems), em placas de 96 poços. Cada amostra foi testada em duplicado, cada uma num volume total de 20 µL, em que 10 µL foram do fluoróforo utilizado, *SYBR Green*, 4 µL de água ultrapura, 2 µL *primer* Reverse, 2 µL *primer* Forward e 2 µL de cDNA. Para cada série de PCR foi feito um controlo negativo para cada par de *primers*, de modo a excluir a ocorrência de contaminações e a formação de dímeros nas reações de amplificação.

Foi utilizado o programa apresentado na figura 7, que além dos ciclos de amplificação incluiu a curva de dissociação, que consiste numa etapa onde ocorreu o aquecimento gradual das reações até aos 95 °C.

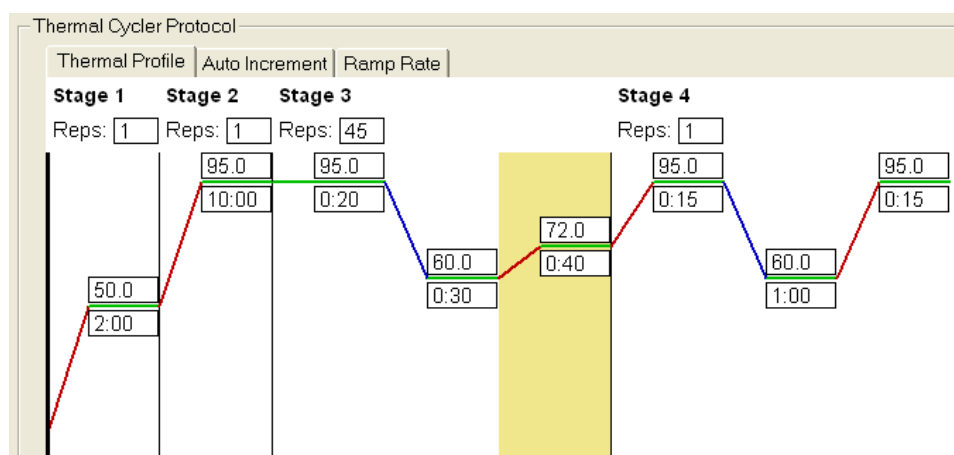


Figura 7 - Programa de PCR tempo real utilizado no presente estudo

Em cada sessão de qPCR, os resultados foram considerados válidos se entre cada duplicado não existisse uma diferença superior a 2 Cts, a temperatura de *melting* (T_m) estivesse de acordo com o esperado e se não existissem ligações inespecíficas (dímeros), análises efetuadas através das curvas de dissociação.

2.2.9. Quantificação Relativa

Para o cálculo da expressão génica foi utilizado o método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), tendo na normalização sido utilizada a média geométrica dos genes de referência analisados (gyrA e lpp3004).

A expressão relativa de RNAm foi calculada utilizando a seguinte expressão: $\Delta\Delta C_t = (Ct_{(GA\ 24h)} - Ct_{(GR\ 24h)}) - (Ct_{(GA\ 0h)} - Ct_{(GR\ 0h)})$

GA 24h = gene alvo na amostra teste

GR 24h = genes referência na amostra teste

GA 0h = gene alvo amostra calibradora

GR 0h = genes referência na amostra calibradora

Os valores positivos indicam um aumento da expressão do gene alvo após a passagem pela co-cultura *Lp-Ac* (amostra teste), os valores negativos traduzem-se numa diminuição da expressão do gene alvo na amostra teste. Apenas foram considerados como significativos valores iguais ou superiores a 2 e valores iguais ou inferiores a -2.

3. Resultados e Discussão

3.1. Morfologia da estirpe ST1905

Na coloração pelo método Gram foi possível verificar diferenças morfológicas entre a estirpe em estudo (ST1905) e a estirpe estudada anteriormente no laboratório, estirpe Paris. Na figura 8, observa-se que as bactérias ST1905 são bacilos curtos (Figura 8A), enquanto que as da estirpe Paris são bacilos longos e finos (Figura 8B). Ambas as culturas tinham o mesmo tempo de incubação em BCYE- α .

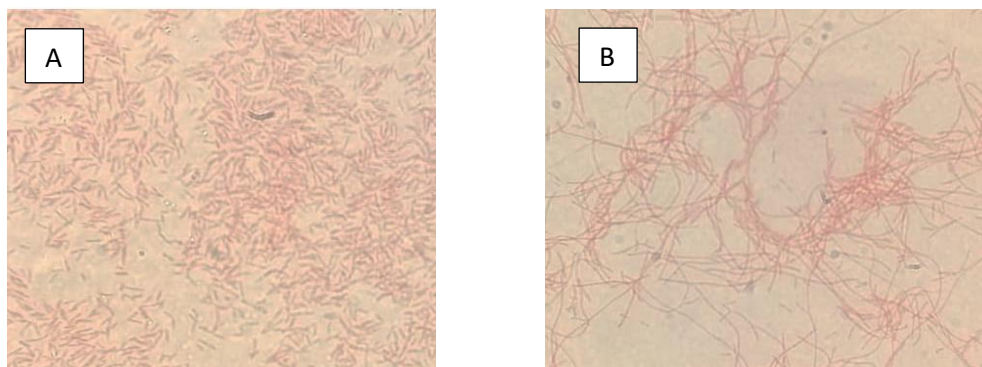


Figura 8 - Coloração pelo método de Gram (1000x) de *Legionella*, incubada a 37°C durante 24h em BCYE- α . A - *Legionella pneumophila* subespécie *fraseri*, ST1905. B – *Legionella pneumophila* subespécie *pneumophila*, estirpe Paris, ST1

Este pleomorfismo está descrito para o género *Legionella* (Mercante et al, 2015), no entanto foi essencial verificar a morfologia da estirpe ST1905 para definir o valor de DO_{550nm} da suspensão a utilizar nos ensaios de co-cultura. Dado que esta estirpe apresentou morfologia diferente da estirpe anteriormente estudada (ST1) foi necessário adaptar o protocolo existente no laboratório.

3.2. Teste de viabilidade

A estirpe ST1905 teve uma viabilidade em água potável, esterilizada, superior a 132 dias, verificando-se que o número de colónias por placa se manteve constante (Figura 9) (valores não quantificados). A avaliação foi realizada no início semanalmente (primeiro mês) e posteriormente mensalmente.

Os resultados da equipa de Skalyi mostram que a viabilidade das bactérias do género *Legionella* se mantêm durante vários meses. Esta equipa testou várias estirpes e vários tipos de água, nomeadamente, água destilada, água da torneira e água de uma torre de arrefecimento de um sistema de ar condicionado, tendo verificado na água da torneira que as bactérias sobreviviam até aos 415 dias. Observaram também que o declínio da população era muito mais rápido em água destilada que em água da torneira (Skalyi et al,

1979). Os nossos resultados confirmam que a estirpe utilizada no presente trabalho também apresenta esta característica de longa viabilidade.

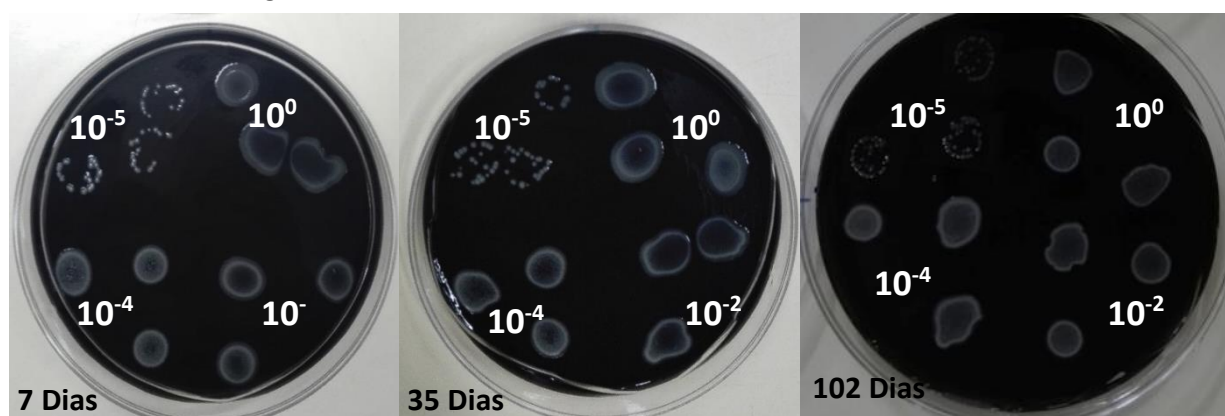


Figura 9 - Teste de viabilidade para a estirpe ST1905, método de Miles e Misra

3.3. Quantificação de suspensão para os ciclos de co-cultura

Foram realizadas quantificações de diferentes suspensões com DO_{550nm} de 1.2, 1 e 0.5 (Tabela2). Foi selecionada a DO_{550nm} de 0,500, com uma quantificação média de 2.1×10^9 para progredir o estudo, dado que as outras DO_{550nm} apresentavam valores muito elevados.

Tabela 2- Média de três ensaios de quantificação para diferentes DO_{550nm} .

DO_{550nm}	Média (UFC/mL)
1.2	3.67×10^{11}
1.0	8.6×10^{10}
0.5	2.1×10^9

3.4. Preparação da cultura AYE para o estudo da expressão génica

No presente trabalho a cultura líquida foi efetuada para garantir que as bactérias utilizadas nos ensaios do estudo da expressão génica se encontravam na mesma fase. De acordo com Molofsky e a sua equipa, em cultura líquida a fase virulenta corresponde à fase estacionária da cultura (Molofsky et al, 2004). A cultura foi considerada em fase estacionária quando em duas leituras consecutivas se verificou uma diferença na DO_{550nm} de, aproximadamente, 0,05.

De forma a otimizar o protocolo dos ensaios de co-cultura para o estudo da expressão génica com a estirpe ST1905, foram realizados diversos ensaios uma vez que foi necessário coordenar a entrada da cultura em fase estacionária para que de imediato as bactérias pudessem ser utilizadas. Os diferentes ensaios realizados consistiram na variação das DO iniciais, no tempo de cultura da *Legionella* em BCYE- α (24h e 48h), nas marcas comerciais de tampão ACES utilizado e no tempo que medeia o início da fase estacionária e a recolha das bactérias.

Dos resultados obtidos foi possível verificar que com uma DO inicial superior a 0,300 (Figura 10) a cultura entra em fase estacionária entre as 7:00 e as 7:30h de incubação (agitação a 170 rpm a 37 °C), enquanto que as culturas com DO_{550nm} inicial inferior a 0,100 (Figura 11) entram em fase estacionária entre as 10:00 e as 10:30h de incubação.

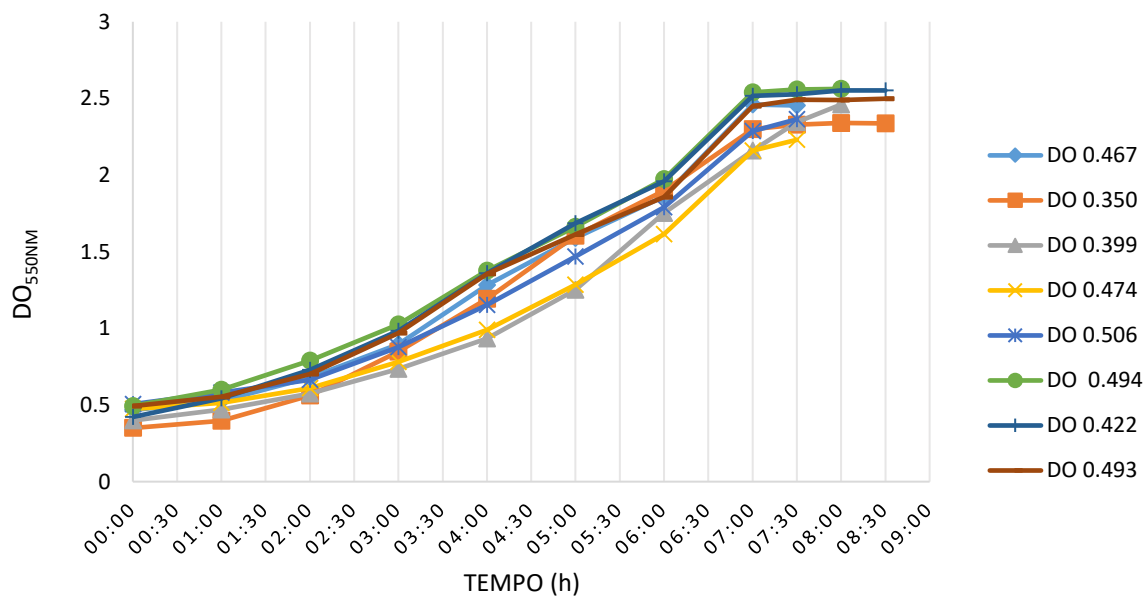


Figura 10 - Curvas de crescimento da estirpe ST19905 em AYE, DO iniciais (T0) superiores a 0,300

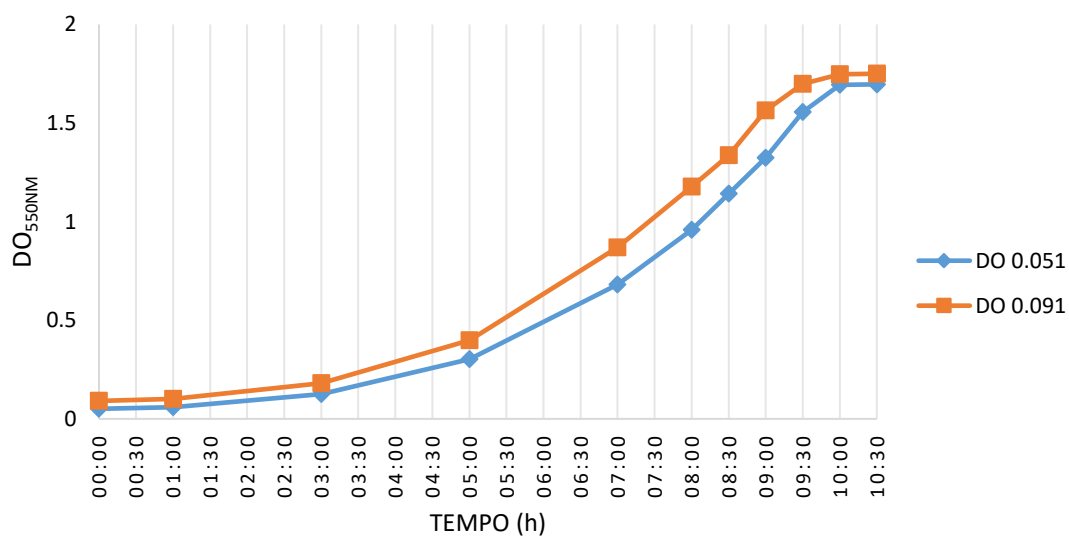


Figura 11 - Curvas de crescimento da estirpe ST1905 em AYE, DO iniciais (T0) inferiores a 0,100

No que diz respeito às culturas em AYE com bactérias provenientes de BCYE- α com 24h e 48h de incubação, observou-se que as culturas com mais tempo de incubação tinham um crescimento mais lento em meio líquido, sendo necessário aproximadamente 20 horas para que se atingisse a fase estacionária, enquanto que utilizando a cultura com apenas 24h de incubação, esta fase ocorria ao fim de 8 horas, inicialmente o protocolo estava definido para a incubação em BCYE- α durante 48h.

Quanto ao teste dos dois tampões ACES, de casas comerciais diferentes, Applichem e Sigma, foi possível verificar que existia variação no tempo de crescimento da cultura, 20h e 17:30h, respetivamente.

Após a realização destes ensaios optamos por utilizar o tampão da casa comercial Sigma, bactérias provenientes de culturas em BCYE- α com 24h de incubação e uma DO_{550nm} inicial superior a 0,300.

Para os primeiros ensaios de co-cultura as bactérias foram recolhidas meia hora após a cultura líquida entrar em fase estacionária. Nestas condições verificou-se que uma pequena percentagem das amibas era infetada e que ao fim de 24h se observavam poucas bactérias extracelulares. Perante estes resultados colocou-se a hipótese de que não tínhamos a cultura de *Legionella* homogeneamente na mesma fase, isto é, nem todas as bactérias estariam em fase transmissiva. Nos ensaios seguintes as bactérias só foram recolhidas uma hora e meia após a cultura ter entrado em fase estacionária. Com esta adaptação, verificou-se uma maior taxa de infeção das amibas e ao fim de 24h observaram-se muitas bactérias extracelulares e muitos destroços de amibas. Considerando que a *Legionella* quando está em fase transmissiva está muito agitada, foram realizadas observações ao microscópio, entre lâmina e lamela, para garantir que esta característica se verificava e que não existiam contaminações por outras bactérias.

3.5. Determinação do tempo de duplicação em cultura líquida

As amostras para a quantificação do tempo de duplicação em cultura líquida foram recolhidas entre as três e as sete horas, dado que, de acordo com a curva de crescimento, foi durante este período que se verificou o crescimento exponencial da cultura. As contagens de UFC apresentaram algumas variações, mas foi possível estimar um tempo de duplicação de 75 minutos para a estirpe ST1905 (Anexo IV). O tempo de duplicação da estirpe ST1905 já tinha sido estudada anteriormente por Chasqueira, mas no estudo foi calculado o tempo de duplicação no interior das amibas onde obtiveram um tempo de 45 minutos (Chasqueira, 2017). Na mesma linha de trabalhos já mais investigadores calcularam os tempos de duplicação de diversas estirpes, nomeadamente, a estirpe *philadelphia* com um tempo de duplicação intracelular de 56 minutos segundo Moffat e Tompkins, mas segundo um artigo de Brüggemann esta estirpe duplica-se em apenas 37 minutos, este autor calculou este tempo também para a estirpe *Lens* (42 minutos) e para a estirpe *Paris* (48 minutos) (Moffat et al, 1992; Brüggemann et al, 2006). A discordância de resultados para as mesmas estirpes indica-nos que as condições de cada experiência podem influenciar os resultados, para além disso

estes estudos demonstraram que cada estirpe tem um tempo de duplicação diferente. Com base nos nossos resultados podemos ainda aferir que dentro da mesma estirpe há variações consoante o ambiente em que as bactérias se encontram, em meio líquido foi 75 minutos (resultado do presente estudo) e no interior das amibas foi 45 minutos (Chasqueira, 2017).

3.6. Estudo da replicação intracelular

Os ciclos de co-cultura foram realizados com MOIs de 10, 100 e 1000, com o objetivo de investigar se existiam diferenças na internalização e multiplicação em função do MOI utilizado. Analisou-se a replicação da estirpe ST1905 durante 24h no interior das amibas, sendo que em todos os ensaios a recolha das bactérias extracelulares foi realizada quando 90% das amibas estavam lisadas.

Com base nos resultados obtidos pode observar-se que no MOI10 o número de bactérias internalizadas é substancialmente menor que o esperado, comparando com o MOI100. O mesmo não se verifica no MOI1000, em que o número de bactérias que entraram nas amibas é muito similar ao do MOI100, podendo considerar-se que não existe diferença na capacidade de internalização. Em trabalhos anteriormente realizados no laboratório verificou-se igualmente que para MOIs elevados (>100) a taxa de internalização não aumenta proporcionalmente, sugerindo que a amiba tem um limite quanto ao número de bactérias que consegue fagocitar (Chasqueira, 2017). Analisando os valores obtidos na quantificação de bactérias extracelulares no final dos ciclos de co-cultura foi possível verificar que existiram diferenças na taxa de multiplicação intracelular em 24h entre o MOI10 e os restantes MOIs (Figura 12) (Tabela 3).

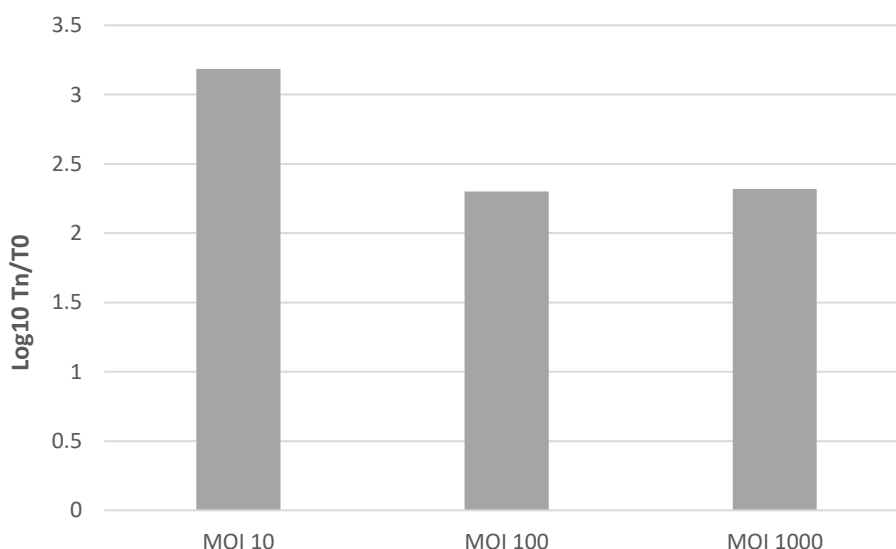


Figura 12 - Valores expressos em $\text{Log}_{10} T_n \text{ (UFC)/(mL do lisado de AC após 24h de co-cultura))} / T_0 \text{ ((UFC)/(mL do lisado de AC após período de contato com Lp))}$ que representam as taxas de multiplicação dos diferentes MOIs

Esta observação é diferente da referida por Moffat e Tompkins que verificaram que o MOI não tem efeito direto na taxa de multiplicação (Moffat et al, 1992).

Tabela 3 - Resultados da quantificação de bactérias internalizadas às 0h e bactérias extracelulares ao fim das 24h. São apresentados os valores médios de 3 ensaios para cada MOI

	MOI10 (UFC/mL)	MOI100 (UFC/mL)	MOI1000 (UFC/mL)
Bactérias internalizadas	3.5×10^4	2.0×10^6	1.6×10^6
Bactérias extracelulares	5.3×10^7	4.0×10^8	3.3×10^8

Partindo do pressuposto que cada ameba internaliza apenas uma bactéria, os nossos resultados sugerem ainda que com o MOI10 o número de amebas infetadas é menor, 1 em cada 50 amebas, contrariamente nos MOIs 100 e 1000 quase todas as amebas foram infetadas (Tabela 4). Corroborando estes dados, observando a cultura ao microscópio invertido, verificamos que o número de amebas que tinha perdido a aderência ao substrato, aproximadamente, às 14h de co-cultura no MOI10 é muito reduzido *versus* o que se verificou nos MOIs 100 e 1000. Os vacúolos de replicação, onde se observaram turbilhões (bactérias com movimentos circulares rápidos) apenas se formaram nas destacadas. Comparativamente no controlo negativo (amebas em MI) 80 a 90 % das amebas mantiveram a aderência durante todo o tempo da experiência (24h).

Tabela 4 - Resultados obtidos nos ensaios de replicação intracelular em Ac. São apresentados os valores médios de 3 ensaios para cada MOI.

	Nº de bactérias internalizadas/ameba (0h)	Nº de bactérias extracelulares/ameba (24h)
MOI 10	0.02	31.06
MOI 100	1.18	235.29
MOI 1000	0.94	196.47

3.7. Estudo da expressão génica

Dos 13 genes selecionados apenas 8 amplificaram no primeiro qPCR realizado com DNA extraído de uma cultura pura de *Legionella*, sendo que dois deles foram os genes de referência (*gyrA* e *lpp3004*). A razão pela qual muitos genes não amplificaram pode ser explicada pelo facto do género *Legionella* apresentar uma grande heterogeneidade genética e a estirpe ST1905 ser filogeneticamente distinta da estirpe Paris (ST1), para a qual os *primers* tinham sido desenhados. O genoma da estirpe ST1905 mostra oito regiões com elevada densidade de SNPs envolvendo cerca de 250 genes (aproximadamente, 8% do genoma) que se pensa terem sido adquiridas por transferência horizontal (Borges et al, 2016).

Dos genes que amplificaram quatro estão associados à virulência, nomeadamente o gene *csrA* (*lpp0845*), conhecido pelo importante papel que tem na adaptação da bactéria ao hospedeiro, na repressão das características da fase transmissiva e por ser um regulador do armazenamento de carbono (Sahr et al, 2017).

O gene *lpp0972*, que codifica para uma proteína similar à *EnhA* e pertence ao grupo de genes que regulam o gene *fliA*, que contribui para a invasão da célula hospedeira (Brüggemann et al, 2006). Os dois últimos pertencem ao sistema secretor tipo II, o *lspH* (*lpp1315*) e o *lspG* (*lpp1316*), importante na translocação de proteínas através da membrana interna das bactérias e no transporte de proteínas do periplasma para o exterior da bactéria. Os restantes genes analisados (*lpp1340* e *lpp1900*) não têm função conhecida.

No protocolo de transcrição do RNA em cDNA, inicialmente foi utilizada a concentração de 200ng/μL de RNA, no entanto, quando se efetuou o PCR verificou-se que os resultados obtidos com o extrato de RNA de 24H (amostra teste) dois genes não amplificavam, o *lpp1316* e o *lpp1340*. De forma a contornar esta limitação foram testadas as concentrações de 800 e 1000 ng/μL de RNA. A quantificação de RNA foi efetuada no espectrofotómetro e por isso não é isenta de erros. Como se pode observar na tabela 5 os Cts mais baixos foram obtidos na amplificação em que se utilizou a concentração de 1000 ng/μL, pelo que, essa foi a concentração adotada para a continuação do trabalho. Dado que se aumentou a concentração de RNA, e tendo em conta que era importante que não existisse nenhum DNA genómico, para continuar o procedimento foi necessário adaptar o protocolo de tratamento com DNase, passando a realizar-se dois passos de adição de DNase, cada um com 30 minutos de incubação.

Tabela 5 - Comparação dos Cts obtidos com diferentes concentrações de RNA.

	200 ng/μL (Ct)	800 ng/μL (Ct)	1000 ng/μL (Ct)
gyrA	35.1	28.6	28.0
	Ind.	28.3	28.3
lpp3004	36.5	31.1	29.9
	35.5	30.0	30.2
lpp1340	Ind.	Ind.	39.3
	Ind.	Ind.	39.6
lpp1316	Ind.	39.8	39.7
	Ind.	Ind.	39.9

Na análise dos resultados da qPCR foram consideradas as curvas de dissociação tendo-se verificado que em todos os ensaios apenas se observou um pico, indicando que não ocorreram ligações inespecíficas (Figura 13), confirmando assim a especificidade dos produtos amplificados. Os valores da *T_m* para os diferentes pares de *primers* variaram entre 78 °C e 82.8 °C.

A especificidade dos *primers* para a *Legionella pneumophila* já tinha sido testada em trabalho anterior (Cunha, 2013), isto é, não se verificaram amplificações com *Ac*.

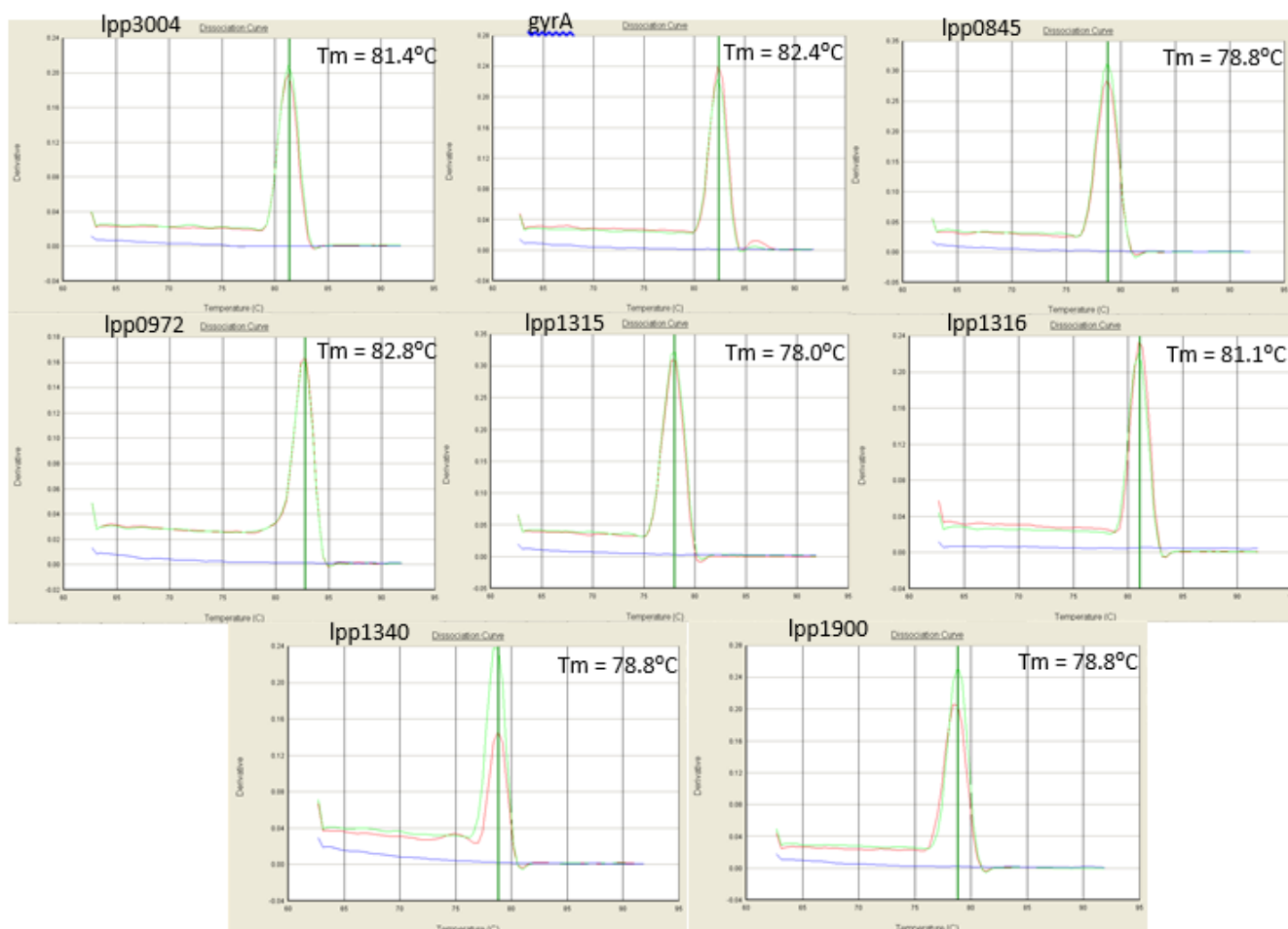


Figura 13 - Curvas de dissociação e T_m para os oito pares de primers analisados.

No decurso do presente trabalho foram realizados quatro ensaios para o estudo da expressão relativa da estirpe ST1905, no entanto, na análise dos resultados serão tidos em conta apenas três.

O quarto ensaio foi eliminado por se ter verificado grande diferença de Cts entre os genes de referência das amostras calibradora e teste. Esta diferença implicou que todos os genes em estudo apresentassem uma expressão relativa aumentada. Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo previamente estabelecido: as bactérias foram recolhidas de cultura líquida (AYE) uma hora e meia após entrarem em fase estacionária; na observação ao microscópio não se visualizou qualquer contaminação; os bacilos encontravam-se bastante agitados; o final da co-cultura ocorreu às 24h, quando se verificou que mais de 90% das amibas estavam lisadas; o procedimento de recolha foi realizado com os mesmos cuidados dos anteriores, nomeadamente, o cuidado de colocar rapidamente as amostras em gelo de modo a parar o metabolismo celular; e os reagentes utilizados desde a extração à qPCR pertenciam ao mesmo lote. Não tendo sido encontrada nenhuma justificação para os resultados obtidos neste quarto ensaio (Anexo V).

Os resultados da expressão gênica foram calculados utilizando três abordagens, a média geométrica dos dois genes de referência e cada um deles em separado (tabela 6). Analisando os valores obtidos verificou-se que não há diferenças a interpretação nas três abordagens, com exceção do lpp0845, no 1º ensaio e do lpp1316, no 2º ensaio que quando utilizado o lpp3004 como gene de referência, apresentaram aumento de expressão. Tendo-se optado por utilizar o recomendado no artigo de Vandesompele, isto é, a média geométrica (Vandesompele et al, 2002)

Tabela 6 - Comparação dos valores de expressão relativa de RNAm utilizando a média geométrica dos dois genes de referência e de cada um em separado.

	1ºensaio					
	lpp0845	lpp0972	lpp1315	lpp1316	lpp1340	lpp1900
gyrA+lpp3004	2.14	1.58	1.61	1.18	-*	1.34
gyrA	1.66	1.23	1.26	-1.09	-*	1.04
lpp3004	2.78	2.05	2.11	1.54	-*	1.74
	2ºensaio					
	lpp0845	lpp0972	lpp1315	lpp1316	lpp1340	lpp1900
gyrA+lpp3004	-5.26	-7.27	-1.41	1.99	2.11	-1.17
gyrA	-8.28	-11.43	-2.22	1.25	1.34	-1.83
lpp3004	-3.29	-4.55	1.13	3.15	3.38	1.37
	3ºensaio					
	lpp0845	lpp0972	lpp1315	lpp1316	lpp1340	lpp1900
gyrA+lpp3004	-21.06	-131.9	-7.28	-*	-*	5.19
gyrA	-21.21	-132.7	-7.32	-*	-*	5.16
lpp3004	-20.82	-130.2	-7.185	-*	-*	5.26

* - Sem amplificação ou Ct superior a 40.

Observando os resultados podemos concluir que nos três ensaios houve concordância de 5 genes em dois ensaios. Os genes lpp0845 e lpp0972 não mostraram variação no primeiro ensaio, mas apresentaram repressão nos restantes ensaios. O lpp1315 manteve a sua expressão nos dois primeiros ensaios e foi reprimido no terceiro. O lpp1900, nos dois primeiros ensaios não apresentou variação de expressão entre a amostra teste e calibradora, tendo no terceiro ocorrido um aumento da expressão. O lpp1316 só apresentou resultados em dois dos ensaios, não mostrando alterações de expressão após passagem pela Ac. Por fim, o lpp1340 não obteve amplificação no primeiro e terceiro ensaios, sendo que no segundo não mostrou alteração de expressão.

Em função destes resultados assumimos que os genes lpp0845, lpp0972 foram reprimidos e os genes lpp1315, lpp1316 e lpp1900 mantiveram a sua expressão após passagem por *Ac*.

Comparando estes resultados com os descritos por Chasqueira (2017) para a estirpe ST1 é possível concluir que em ambas as estirpes o gene lpp0972 apresenta repressão (69.6 vezes) e o gene lpp1900 não apresenta variações após passagem por *Ac*. Quanto aos restantes genes verificou-se que as variações parecem ser específicas de estirpe. Os genes lpp0845, lpp1315 e o lpp1316 na estirpe ST1 aumentaram a sua expressão relativa em média, 30, 5.5 e 5.9 vezes, respetivamente (Chasqueira, 2017). Na estirpe ST1905 o lpp0845 está reprimido com um valor de 13.2 vezes (média de dois ensaios) e os dois últimos mantêm-se constantes após passagem pela *Ac*.

Ao longo dos anos foram publicados alguns estudos relacionados com o transcrito do género *Legionella*, por exemplo, têm sido alvo de estudo a síntese do flagelo e a sua regulação (Albert-Weissenberger et al, 2010), o perfil génico durante a multiplicação no interior de macrófagos (Li et al, 2015) e em diferentes meios de crescimento (Faucher et al, 2011), o transcrito das bactérias que constituem os biofilmes (Hindré et al, 2008) e os mecanismos que o gene *csrA* controla (Sahr et al, 2017). Estes estudos são recentes, o que mostra o crescente interesse em conhecer o funcionamento do metabolismo das bactérias do género *Legionella*, as interações com os seus hospedeiros e como estas influenciam as bactérias, no entanto, só um estudo publicado em 2018 estudou a expressão génica de duas estirpes de *Legionella* (*L. pneumophila* e *L. feeleii*) após a passagem por *Ac*, os autores concluíram que os dados obtidos sugeriam a existência de um aumento de expressão dos genes associados à virulência e, consequentemente, a ativação de mecanismos de sobrevivência da bactéria contra respostas imunes do hospedeiro (Gomes et al, 2018).

4. Conclusões

O presente estudo foi realizado com uma estirpe de *Lp* subespécie *fraseri* do serogrupo 1, genótipo ST1905, que originou o terceiro maior surto de DL a nível mundial, ocorrido em 2014, no concelho de Vila Franca de Xira, envolvendo no total 403 casos e 14 óbitos. Esta estirpe é específica de Portugal, só tendo até ao momento sido isolada em doentes provenientes desta região geográfica.

Os resultados obtidos permitem concluir que morfologicamente a bactéria é caracterizada por bacilos curtos, apresenta um tempo de duplicação, em meio AYE, de 75 minutos e de viabilidade, em água potável esterilizada, superior a 132 dias num ambiente que pretendeu mimetizar as condições que a bactéria encontra nas canalizações (temperatura ambiente e escuro). Estes dois dados indicam que quando existe uma contaminação por esta estirpe de *Legionella* é importante e urgente proceder ao tratamento do foco a fim de tentar alcançar a sua erradicação, caso contrário a bactéria irá permanecer viável e multiplicar-se rapidamente nas canalizações das instalações por muito tempo e com rapidez, aumentando a probabilidade de provocar episódios de infeção.

Os ensaios de Lp-Ac realizados sugerem que a Ac tem um limite para o número de bactérias que consegue fagocitar e que o MOI10 apresenta uma taxa de multiplicação superior aos restantes MOIs testados (MOI100 e MOI1000).

No estudo da expressão génica só foi possível analisar sete dos treze genes selecionados, dois genes de referência (*gyrA* e *lpp3004*), quatro relacionados com a virulência (*lpp0845*, *lpp0972*, *lpp1315* e *lpp1316*) e um gene hipotético (*lpp1900*). Verificou-se que os restantes genes não estavam presentes no genoma desta estirpe e que após passagem por Ac, o *lpp0845* e o *lpp0972* evidenciaram repressão da sua expressão, sendo que, os outros não apresentaram alterações. Com estes resultados colocou-se a hipótese de que a interação da estirpe ST1905 com a Ac não aumenta a sua virulência.

Este estudo apresentou como limitações a não reprodutibilidade dos resultados da expressão génica, tendo sido apenas considerados os valores de dois dos quatro ensaios realizados. Não foram identificados nenhuns desvios ao protocolo definido que justifiquem as discrepâncias verificadas, no entanto, a morosidade dos ensaios de co-cultura e a necessidade de rapidez na paragem do metabolismo celular, para que não existisse alteração da expressão génica, podem ter condicionado os resultados.

Após a aquisição de treino na realização das culturas líquidas, na manutenção das culturas de amibas e nos procedimentos para os ciclos de co-cultura o desenvolvimento do trabalho decorreu sem qualquer contaminação.

Considerando que existe uma grande heterogeneidade genética dentro do género *Legionella*, este tipo de estudos devem ser alargados a mais estirpes patogénicas para que se possa obter a informação sobre o seu

tempo de duplicação e viabilidade na água de ecossistemas de risco e a sua capacidade de replicação intracelular em diferentes hospedeiros.

Perspetivas futuras

- Para a estirpe em estudo (ST1905) será pertinente avaliar alguns genes específicos, como por exemplo, o gene *lpg0742/IdsA* que codifica uma proteína que interfere na montagem e/ou ativação do sistema Dot/Icm, o gene *lpg2112* que codifica uma proteína relacionada ao potenciador de infecciosidade de macrófagos, o gene *lpg2094* um parálogo do gene *crsA* que codifica uma proteína de ligação a RNA integrada numa superfamília de reguladores globais (Borges et al, 2016).
- Realizar esta análise da expressão génica em outros hospedeiros ambientais e em macrófagos.

5. Bibliografia

- Albert-Weissenberger, C., Sahr, T., Sismeiro, O., Hacker, J., Heuner, K., & Buchrieser, C. (2010). Control of flagellar gene regulation in *Legionella pneumophila* and its relation to growth phase. *Journal of bacteriology*, 192(2), 446-455.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209-219.
- Avni, T., Bieber, A., Green, H., Steinmetz, T., Leibovici, L., & Paul, M. (2015). Diagnostic accuracy of PCR alone and compared to urinary antigen testing for detection of *Legionella* spp.: a systematic review. *Journal of clinical microbiology*, 54(2), 401-411.
- Ballard, A. L., Fry, N. K., Chan, L., Surman, S. B., Lee, J. V., Harrison, T. G., & Towner, K. J. (2000). Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *Journal of clinical microbiology*, 38(11), 4215-4218.
- Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J. V., Pond, K., & Surman-Lee, S. (2007). *Legionella and the prevention of legionellosis*. World Health Organization.
- Benoliel, M. J., Fernando, A. L. A. C., Diegues, P., Soares, A. S., Pinto, A., Martins, V., & Silva, I. (2014). (2ª Edição). *Prevenção e Controlo de Legionella nos Sistemas de água*. Instituto Português da Qualidade.
- Borges, V., Nunes, A., Sampaio, D. A., Vieira, L., Machado, J., Simões, M. J., ... & Gomes, J. P. (2016). *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Scientific reports*, 6, 26261.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Epple, P., Bibb, W. F., McKinney, R. M., Starnes, R. W., Colville, J. M., Selander, R. K., Edelstein, P. H & Moss, C. W. (1988). *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(9), 1695-1703.
- Brüggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M. A., Gouyette, C., & Buchrieser, C. (2006). Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cellular microbiology*, 8(8), 1228-1240.
- Carvalho, F. R., Nastasi, F. R., Gamba, R. C., Foronda, A. S., & Pellizari, V. H. (2008). Occurrence and diversity of Legionellaceae in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Current microbiology*, 57(4), 294-300.

CDC. (2018). *Legionella* (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever). Outbreaks. Acedido a 20 de janeiro de 2019 em <https://www.cdc.gov/legionella/outbreaks.html>.

LPSN. Genus *Legionella*. Acedido a 5 de Fevereiro de 2019 em <http://www.bacterio.net/legionella.html>

Cebrián, F., Montero, J. C., & Fernández, P. J. (2018). New approach to environmental investigation of an explosive legionnaires' disease outbreak in Spain: early identification of potential risk sources by rapid *Legionella* spp immunosensing technique. *BMC infectious diseases*, 18(1), 696.

Chasqueira, M. D. J. F. (2017). Doença dos legionários: estudo da diversidade de isolados de legionella obtidos em Portugal, 1987-2016 (Tese Doutoramento, Faculdade de Ciências Médicas). Lisboa.

Correia, A. M., Ferreira, J. S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., ... & Guerreiro, M. (2016). Probable person-to-person transmission of Legionnaires' disease. *New England Journal of Medicine*, 374(5), 497-498.

Cunha, B. A., Burillo, A., & Bouza, E. (2016). Legionnaires' disease. *The Lancet*, 387(10016), 376-385.

Cunha, C. I. G. D. S. (2013). Estudo da expressão génica da *Legionella pneumophila* estirpe paris após co-cultura em *Acanthamoeba castellanii* (Tese Mestrado, Faculdade de Ciências Médica). Lisboa.

Den Boer, J. W., & Yzerman, E. P. F. (2004). Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(12), 871-878.

Descours, G., Suet, A., Ginevra, C., Campese, C., Slimani, S., Ader, F., Che, D., Lina, G. & Jarraud, S. (2012). Contribution of amoebic coculture to recovery of Legionella isolates from respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months. *Journal of clinical microbiology*, 50(5), 1725-1726.

Dias, A., Cysneiros, A., Lopes, F. T., von Amann, B., Costa, C., Dionísio, P., Carvalho, J., Durão, V., Carvalho, G., Paula, F., Serrano, M., Nunes, B., Marques, T., Froes, F. & Bárbara, C. (2017). The typical presentation of an atypical pathogen during an outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, 2014. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*, 23(3), 117-123.

Diederer, B. M. W. (2008). Legionella spp. and Legionnaires' disease. *Journal of infection*, 56(1), 1-12.

Diegues, P., & Martins, V. (2013). Prevenção da Doença dos Legionários. *Direção Geral de Saude*.

Direção Geral de Saúde (DGS). Norma 024/2017 de 15/11/2017. Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0242017-de-151120171.aspx>.

- Dominguez, A., Alvarez, J., Sabria, M., Carmona, G., Torner, N., Oviedo, M., Cayla, J., Minguell, S., Barrabeij, I., Sala, M., Godoy, P. & Camps, N. (2009). Factors influencing the case-fatality rate of Legionnaires' disease. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(3), 407-412.
- Dunbar, L. M., Khashab, M. M., Kahn, J. B., Zadeikis, N., Xiang, J. X., & Tennenberg, A. M. (2004). Efficacy of 750-mg, 5-day levofloxacin in the treatment of community-acquired pneumonia caused by atypical pathogens. *Current medical research and opinion*, 20(4), 555-563.
- Eisenreich, W., & Heuner, K. (2016). The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS letters*, 590(21), 3868-3886.
- Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2013). From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. In *Molecular Mechanisms in Legionella Pathogenesis* (pp. 1-34). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Faucher, S. P., Mueller, C. A., & Shuman, H. A. (2011). *Legionella pneumophila* transcriptome during intracellular multiplication in human macrophages. *Frontiers in microbiology*, 2, 60.
- Faulkner, G., & Garduño, R. A. (2002). Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology*, 184(24), 7025-7041.
- Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews*, 15(3), 506-526.
- Finsel, I., & Hilbi, H. (2015). Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: how to kill one bird with many stones. *Cellular microbiology*, 17(7), 935-950.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C., & Brachman, P. S. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 297(22), 1189-1197.
- Fry, N. K., Warwick, S., Saunders, N. A., & Embley, T. M. (1991). The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *Microbiology*, 137(5), 1215-1222.
- Gaia, V., Casati, S., & Tonolla, M. (2011). Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Systematic and applied microbiology*, 34(1), 40-44.
- Gallagher, S. R., & Wiley, E. A. (Eds.). (2010). *Current protocols essential laboratory techniques*. John Wiley & Sons.

- García-Fulgueiras, A., Navarro, C., Fenoll, D., García, J., González-Diego, P., Jiménez-Buñuales, T., ... & Segovia, M. (2003). Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerging infectious diseases*, 9(8), 915-921.
- Garrity, G. M., Brown, A., & Vickers, R. M. (1980). *Tatlockia* and *Fluoribacter*: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30(4), 609-614.
- George, F., Shivaji, T., Pinto, C. S., Serra, L. A. O., Valente, J., Albuquerque, M. J., ... & Marques, T. (2016). A large outbreak of Legionnaires Disease in an industrial town in Portugal. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 34(3), 199-208.
- Gomes, T. S., Gjiknuri, J., Magnet, A., Vaccaro, L., Ollero, D., Izquierdo, F., Fenoy, S., Hurtado, C. & del Águila, C. C. (2018). The influence of *Acanthamoeba*-*Legionella* interaction in the virulence of two different *Legionella* species. *Frontiers in microbiology*, 9, 2962.
- Govindarajan, R., Duraiyan, J., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Microarray and its applications. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(Suppl 2), S310.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026.
- Hilbi, H., Hoffmann, C., & Harrison, C. F. (2011). *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environmental microbiology reports*, 3(3), 286-296.
- Hindré, T., Brüggemann, H., Buchrieser, C., & Hechard, Y. (2008). Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology*, 154(1), 30-41.
- Jarraud, S., Descours, G., Ginevra, C., Lina, G., & Etienne, J. (2013). Identification of *Legionella* in clinical samples. In *Legionella* (pp. 27-56). Humana Press, Totowa, NJ.
- Khodr, A., Kay, E., Gomez-Valero, L., Ginevra, C., Doublet, P., Buchrieser, C., & Jarraud, S. (2016). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infection, genetics and evolution*, 43, 108-122.
- Ko, K. S., Hong, S. K., Lee, K. H., Lee, H. K., Park, M. Y., Miyamoto, H., & Kook, Y. H. (2003). Detection and identification of *Legionella pneumophila* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of microbiological methods*, 54(3), 325-337.
- Kodani, M., Yang, G., Conklin, L. M., Travis, T. C., Whitney, C. G., ... & Fields, B. S. (2011). Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens. *Journal of clinical microbiology*, 49(6), 2175-2182.

- Lau, H. Y., & Ashbolt, N. J. (2009). The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of applied microbiology*, 107(2), 368-378.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., & Faucher, S. P. (2015). Transcriptomic changes of Legionella pneumophila in water. *BMC genomics*, 16(1), 637.
- Lovén, J., Orlando, D. A., Sigova, A. A., Lin, C. Y., Rahl, P. B., Burge, C. B., ... & Young, R. A. (2012). Revisiting global gene expression analysis. *Cell*, 151(3), 476-482.
- Lu, X., Mo, Z. Y., Zhao, H. B., Yan, H., & Shi, L. (2011). LAMP-based method for a rapid identification of Legionella spp. and Legionella pneumophila. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(1), 179.
- Marques, M. T., Froes, F., Brum, G., & Esteves, A. C. S. (2003). Doença dos Legionários: Protocolo de diagnóstico. *Lisboa: Centro Regional de Saúde Pública de Lisboa e Vale do Tejo*.
- Marrão, G., Veríssimo, A., Bowker, R. G., & da Costa, M. S. (1993). Biofilms as major sources of Legionella spp. in hydrothermal areas and their dispersion into stream water. *FEMS microbiology ecology*, 12(1), 25-33.
- McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A., Dowdle, W. R., & Laboratory Investigation Team*. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*, 297(22), 1197-1203.
- Mercante, J. W., & Winchell, J. M. (2015). Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 95-133.
- Moffat, J. F., & Tompkins, L. S. (1992). A quantitative model of intracellular growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii. *Infection and immunity*, 60(1), 296-301.
- Molofsky, A. B., & Swanson, M. S. (2004). Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Molecular microbiology*, 53(1), 29-40.
- Morgante, C., & Blawid, R. (2016). Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos. *Embrapa Semiárido-Documentos*.
- Mou, Q., & Leung, P. H. (2018). Differential expression of virulence genes in Legionella pneumophila growing in Acanthamoeba and human monocytes. *Virulence*, 9(1), 185-196.
- Muder, R. R., & Victor, L. Y. (2002). Infection due to Legionella species other than L. pneumophila. *Clinical infectious diseases*, 35(8), 990-998.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* Vol. 51, 263-273
- Nagalakshmi, U., Waern, K., & Snyder, M. (2010). RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. *Current protocols in molecular biology*, 89(1), 4-11.
- Nascimento, S., Suarez, E. R., & Pinhal, M. A. D. S. (2010). Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Revista Brasileira de Medicina*, 67, 7-19.
- Oliva, G., Sahr, T., & Buchrieser, C. (2018). The life cycle of *L. pneumophila*: cellular differentiation is linked to virulence and metabolism. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 3.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*, 18(6), 407-421.
- Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H. R., Zhang, N., Kumar, K., ... & Abubakar, I. (2014). Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *The Lancet infectious diseases*, 14(10), 1011-1021.
- Price, C. T., & Kwaik, Y. A. (2014). The transcriptome of *Legionella pneumophila*-infected human monocyte-derived macrophages. *PloS one*, 9(12), e114914.
- Reller, L. B., Weinstein, M. P., & Murdoch, D. R. (2003). Diagnosis of *Legionella* infection. *Clinical infectious diseases*, 36(1), 64-69.
- Rittig, M. G., Burmester, G. R., & Krause, A. (1998). Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed. *Trends in microbiology*, 6(10), 384-388.
- Sabrià, M., Pedro-Botet, M. L., Gómez, J., Roig, J., Vilaseca, B., Sopena, N., & Baños, V. (2005). Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease. *Chest*, 128(3), 1401-1405.
- Sahr, T., Rusniok, C., Impens, F., Oliva, G., Sismeiro, O., Coppée, J. Y., & Buchrieser, C. (2017). The *Legionella pneumophila* genome evolved to accommodate multiple regulatory mechanisms controlled by the CsrA-system. *PLoS genetics*, 13(2), e1006629.
- Sheehan, K. B., Henson, J. M., & Ferris, M. J. (2005). *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(1), 507-511.
- Shin, S., & Roy, C. R. (2008). Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cellular microbiology*, 10(6), 1209-1220.

- Shivaji, T., Pinto, C. S., San-Bento, A., Serra, L. O., Valente, J., Machado, J., ... & Vasconcelos, P. (2014). A large community outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. *Eurosurveillance*, 19(50), 20991.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791.
- Skalyi, P., & McEachern, H. V. (1979). Survival of the Legionnaires' disease bacterium in water. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 662-663.
- Steensels, D., Reynders, M., Descheemaeker, P., Curran, M. D., Jacobs, F., Denis, O., ... & Montesinos, I. (2015). Clinical evaluation of a multi-parameter customized respiratory TaqMan® array card compared to conventional methods in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Virology*, 72, 36-41.
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., & Glöckner, G. (2007). Legionella pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International journal of medical microbiology*, 297(7-8), 577-587.
- Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G., & Roy, C. R. (2001). How the parasitic bacterium Legionella pneumophila modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *Journal of Cell Science*, 114(24), 4637-4650.
- Tossa, P., Deloge-Abarkan, M., Zmirou-Navier, D., Hartemann, P., & Mathieu, L. (2006). Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health*, 6(1), 112.
- UE (Europeia, U) - Decisão de Execução (EU) 2018/945 da Comissão de 22 de junho de 2018 relativa a doenças transmissíveis e problemas de saúde especiais conexos que devem ser abrangidos pela vigilância epidemiológica, bem como às definições de casos pertinentes. (Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2018:170:FULL&from=PT>)
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), research0034-1.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5), 619-626.
- Veríssimo, A., Marrao, G., da Silva, F. G., & Da Costa, M. S. (1991). Distribution of Legionella spp. in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of São Miguel, Azores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(10), 2921-2927.

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.

6. ANEXOS

Anexo I – Protocolos dos meios utilizados no estudo

A- Meio de *Thioglycollate* – Meio de conservação

- 1- Pesar na balança analítica 2,84 g de *thioglycollate*
- 2- Dissolver em 85 mL de água destilada
- 3- Juntar 15 mL de glicerol
- 4- Autoclavar a 120°C durante 20 minutos
- 5- Na câmara de segurança biológica, distribuir o preparado para criotubos estéreis
- 6- Guardar os criotubos num frasco e colocar no frigorífico

B- Meio BCYE- α

- 1- Pesar na balança analítica 2,77 g de *Legionella* CYE agar base (Oxoid)
- 2- Adicionar 100 mL de água estéril
- 3- Ferver na placa de aquecimento
- 4- Autoclavar a 120°C durante 20 minutos
- 5- Deixar arrefecer até atingir a temperatura de 50°/60°C
- 6- Adicionar um frasco de *Legionella* BCYE *growth supplement* e misturar
- 7- Junto ao bico de *Bunsen*, distribuir 20 mL para cada placa de *petri*
- 8- Colocar uma placa na estufa a 37°C durante 48h (teste de esterilidade) e guardar as restantes placas no frigorífico (2 a 8°C)
- 9- Observar a ausência ou presença de crescimento na placa que ficou na estufa

C- Meio Líquido (AYE)

- 1- Pesar na balança analítica:
 - a. 0,125 g de pirofosfato de ferro
 - b. 5 g de ACES
 - c. 5 g de extrato de levedura
 - d. 0,2 g de L-cysteina
- 2- Dissolver a quente e com agitação o pirofosfato de ferro em 50 mL de água destilada (deixar arrefecer)
- 3- Dissolver com agitação o ACES e o extrato de levedura em 450 mL de água destilada
- 4- Acertar o pH=6,9 (pH Meter- Metrhm)
- 5- Adicionar a L-cysteina e a solução de pirofosfato de ferro (preparada no ponto 2)
- 6- Esterilizar o meio utilizando uma bomba de vácuo e um filtro de 0,22 μ m na câmara de fluxo laminar Classe II (Nuaire)

D- Meio de multiplicação – PYG

1- Preparação das várias soluções *stock*:

- Cloreto de cálcio (CaCl_2) (0,05M)
- Di-Hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (0,25M)
- Sulfato de magnésio (MgSO_4) (0,4M)
- Di-sódio hidrogenofosfato (Na_2HPO_4) (0,25M)
- Pirofosfato de ferro ($\text{Fe}_4\text{O}_{21}\text{P}_6$) (0,005M)

a. Pesar na balança analítica:

- 0,28 g de Cloreto de Cálcio
- 1,7 g de Di-Hidrogenofosfato de Potássio
- 4,93 g de Sulfato de Magnésio
- 1,775 g de Di-sódio Hidrogenofosfato
- 0,1863 g de Pirofosfato de ferro

b. Dissolver separadamente cada um dos componentes em copo com 50 mL de água destilada, guardar a 4°C. O pirofosfato de ferro deve ser dissolvido a quente e com agitação, guardar a -20°C.

2- Pesar na balança analítica:

- 1 g de Citrato de Sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)
- 20 g de Triptona
- 1 g de Extrato de levedura
- 18 g de Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

3- Dissolver todos os componentes em 950 mL de água destilada

4- Adicionar 10 mL de cada uma das soluções *stock* preparadas anteriormente (KH_2PO_4 , MgSO_4 , Na_2HPO_4 e $\text{Fe}_4\text{O}_{21}\text{P}_6$) e 8 mL de CaCl_2

5- Agitar e esterilizar o meio, utilizando uma bomba de vácuo com um filtro de 0,22 μm na câmara de fluxo laminar Classe II (Nuaire)

6- Testar a esterilidade colocando uma placa de *petri* com 2 a 3 mL de meio na estufa a 37°C durante uma semana. O meio fica em quarentena até terminar a observação da placa de *petri*.

E- Meio de infecção - MI

1- Preparação das várias soluções *stock*:

- Cloreto de cálcio (CaCl_2) (0,05M)
- Di-Hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (0,25M)
- Sulfato de magnésio (MgSO_4) (0,4M)
- Di-sódio hidrogenofosfato (Na_2HPO_4) (0,25M)
- Pirofosfato de ferro ($\text{Fe}_4\text{O}_{21}\text{P}_6$) (0,005M)

a. Pesar na balança analítica:

- 0,28 g de Cloreto de Cálcio
- 1,7 g de Di-Hidrogenofosfato de Potássio
- 4,93 g de Sulfato de Magnésio
- 1,775 g de Di-sódio Hidrogenofosfato
- 0,1863 g de Pirofosfato de ferro

b. Dissolver separadamente cada um dos componentes em copo com 50 mL de água destilada, guardar a 4°C. O pirofosfato de ferro deve ser dissolvido a quente e com agitação, guardar a -20°C.

2- Pesar na balança analítica 1 g de Citrato de Sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)

3- Dissolver em 950 mL de água destilada

4- Adicionar 10 mL de cada uma das soluções *stock* preparadas anteriormente (KH_2PO_4 , MgSO_4 , Na_2HPO_4 e $\text{Fe}_4\text{O}_{21}\text{P}_6$) e 8 mL de CaCl_2

5- Agitar e esterilizar o meio, utilizando uma bomba de vácuo com um filtro de 0,22 μm na câmara de fluxo laminar Classe II (Nuaire)

6- Testar a esterilidade colocando uma placa de *petri* com 2 a 3 mL de meio na estufa a 37°C durante uma semana. O meio fica em quarentena até terminar a observação da placa de *petri*.

Anexo II - Protocolo de descongelação das amibas

- 1- Tirar o criotubo da arca a -80°C
- 2- Descongelar a 37°C em banho maria
- 3- Lavar as amibas com MM para retirar o DMSO
- 4- Verter o conteúdo do criotubo para um tubo de plástico estéril com 6 a 7 mL de MM. Esperar 10 minutos
- 5- Centrifugar 10 min a 10000 rpm
- 6- Decantar o sobrenadante e juntar 3 mL de MM
- 7- Dividir o conteúdo para frascos de 25 cm³ (1 mL de suspensão e 3 mL de MM)
- 8- Incubar à temperatura ambiente

Anexo III - Coloração de Gram

- 1-** Preparar o esfregaço, deixar secar
- 2-** Fixar à chama
- 3-** Cobrir o esfregaço com cristal violeta, deixar atuar durante 60 segundos
- 4-** Lavar com água corrente
- 5-** Cobrir o esfregaço com lugol, deixar atuar durante 60 segundos
- 6-** Lavar com água corrente
- 7-** Inclinar a lâmina a gotejar álcool/acetona, cerca de 15 segundos
- 8-** Lavar com água corrente
- 9-** Cobrir o esfregaço com safranina, deixar atuar 30 segundos
- 10-** Lavar com água corrente
- 11-** Secar a lâmina ao ar ou com auxílio de um papel
- 12-** Pingar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e observar ao microscópio com objetiva de imersão (100x)

Anexo IV – Resultados do tempo de duplicação

Tabela 7 – Contagem de UFC da cultura líquida na fase estacionária.

Horas	1ºensaio (UFC/mL)	2ºensaio (UFC/mL)	3ºensaio (UFC/mL)
03:00	1.30×10^{10}	6.30×10^{10}	6.75×10^8
04:00	2.60×10^{10}	1.63×10^{11}	1.35×10^9
05:00	6.00×10^{10}	3.30×10^{11}	2.70×10^9
06:00	2.00×10^{10}	7.00×10^{11}	3.70×10^9
07:00	5.00×10^{10}	1.37×10^{12}	5.60×10^9

Tabela 8 – Média dos três ensaios do número de gerações e do tempo de duplicação.

	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	Média
Média do número de gerações	0.49	1.11	0.76	0.79
Média do tempo de duplicação (minutos)	59.84	49.54	115.91	75

Anexo V – Resultados da expressão relativa do RNAm

Tabela 9 - Média dos dois genes de referência para cada ensaio.

	Genes de referência	
	0h	24h
gyrA	32.08	29.49
	30.17	29.34
3004	32.04	31.09
	32.26	31.30
Média	31.63	30.29
gyrA	29.80	28.75
	29.84	29.40
3004	30.37	30.98
	29.82	30.38
Média	29.96	29.87
gyrA	32.91	33.67
	31.96	34.31
3004	32.17	34.85
	32.76	33.25
Média	32.45	34.01
gyrA	24.14	29.93
	23.10	29.47
3004	23.26	31.78
	23.22	31.97
Média	23.43	30.77

Tabela 10 - Resultados do 1ºensaio da expressão gênica da estirpe ST1905 após passagem em Ac.

1ºensaio	0h	24h	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
845	26.38	24.38	-1.10	2.137
	26.87	24.01		
Média	26.62	24.19		
972	31.45	28.89	-0.66	1.577
	31.02	29.60		
Média	31.23	29.24		
1315	34.81	33.41	-0.69	1.617
	35.75	33.09		
Média	35.28	33.25		
1316	43.02	41.14	-0.24	1.184
	41.96	40.68		
Média	42.49	40.91		
1340	39.69	ind		
	40.00	39.20		
Média	39.84	-		
1900	31.83	30.40	-0.42	1.338
	32.24	30.16		
Média	32.03	30.28		

Tabela 11 – Resultados do 2º ensaio da expressão gênica da estirpe ST1905 após passagem em Ac.

2ºensaio	0h	24h	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
845	24.71	26.85	2.40	0.190	-5.3
	24.68	27.15			
Média	24.69	27.00			
972	29.06	31.61	2.86	0.138	-7.3
	28.87	31.86			
Média	28.96	31.73			
1315	30.53	31.24	0.50	0.708	-1.4
	31.17	31.27			
Média	30.85	31.25			
1316	37.58	35.18	-0.99	1.987	
	36.91	37.17			
Média	37.24	36.16			
1340	37.20	36.20	-1.08	2.113	
	36.91	35.57			
Média	37.05	35.88			
1900	29.95	30.14	0.22	0.858	-1.2
	29.84	29.91			
Média	29.89	30.02			

Tabela 12 - Resultados do 3º ensaio da expressão gênica da estirpe ST1905 após passagem em Ac.

3ºensaio	0h	24h	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
845	24.73	30.89	4.40	0.047	-21.1
	24.40	30.17			
Média	24.56	30.53			
972	25.52	34.44	7.04	0.008	-131.9
	25.76	34.06			
Média	25.64	34.25			
1315	31.90	36.35	2.86	0.137	-7.3
	31.80	36.21			
Média	31.85	36.28			
1316	38.34	Ind			
	37.41	Ind			
Média	37.88	-			
1340	38.53	38.78			
	37.95	Ind			
Média	38.24	-			
1900	32.28	32.15	-2.37	5.187	
	33.15	31.66			
Média	32.71	31.90			

Tabela 13 - Resultados do 4º ensaio da expressão gênica da estirpe ST1905 após passagem em Ac.

4ºensaio	0h	24h	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
845	21.67	27.40	-2.46	5.511
	21.15	25.22		
Média	21.41	26.29		
972	23.93	28.15	-2.71	6.550
	23.55	28.59		
Média	23.74	28.37		
1315	30.03	32.50	-4.60	24.305
	30.20	33.21		
Média	30.11	32.85		
1316	34.41	36.32	-3.41	10.636
	34.17	40.22		
Média	34.29	38.22		
1340	38.51	44.05	-2.93	7.640
	36.22	39.58		
Média	37.35	41.76		
1900	26.73	29.92	-4.11	17.218
	26.19	29.47		
Média	26.46	29.69		